

# ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

## CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'INFLUENCE DE L'INDOL SUR LES SCLÉROSES

par M. S. DRATCHINSKI

(Laboratoire de M. Metchnikoff.)

(Avec les Pl. VI à XI.)

L'étude expérimentale de l'action physiologique de l'indol et de ses dérivés sur l'organisme animal présente un grand intérêt, tant au point de vue théorique qu'au point de vue pratique.

Presque du premier moment de la vie de l'animal jusqu'à sa mort, un processus de putréfaction intestinale dû à l'action de la flore microbienne s'accomplit dans son intestin; parmi les produits de putréfaction qui se forment sans cesse, à côté d'autres dérivés de la série aromatique, apparaît aussi l'indol. Ce produit de l'activité vitale de la flore intestinale, sans cesse formé et sans cesse absorbé, se transforme dans le foie en indoxylsulfate et en indoxylglycuronate, circule sous cette forme (et peut-être sous forme d'autres modifications) et est éliminé par l'organisme dans l'urine.

L'organisme n'en souffre-t-il pas?

En posant ce problème, ou le problème de la toxicité de l'indol, nous abordons forcément le problème plus général de l'autointoxication intestinale due à l'action de la flore microbienne, le facteur qui joue, d'après la théorie de Metchnikoff, un rôle prédominant dans l'usure, dans le vieillissement

de l'organisme en général et dans la sénilité précoce en particulier.

On comprend ainsi l'intérêt théorique qui se rattache à la solution du problème de la toxicité et de la non-toxicité de l'indol.

Metchnikoff a aussi indiqué les moyens pratiques de la lutte contre l'autointoxication intestinale, en préconisant la transformation de la flore sauvage nuisible pour l'organisme en une flore artificielle utile. L'introduction des microbes utiles dans l'intestin (bacilles lactiques, surtout bac. bulgare) crée des conditions qui réduisent au minimum l'action de la flore sauvage.

Le problème de la toxicité de l'indol présente donc aussi un grand intérêt pratique; si l'indol est un des produits de la putréfaction intestinale jouant un rôle dans l'autointoxication, l'abondance de l'indoxyl dans l'urine nous donnera des indications pratiques pour la lutte contre l'effet désastreux de l'empoisonnement ininterrompu de l'organisme, l'introduction des microbes utiles ou l'utilisation des régimes alimentaires spéciaux pouvant éliminer ce facteur toxique, qui apparaît principalement, sinon uniquement, grâce à l'absorption intestinale de l'indol, de provenance microbienne.

Bien que l'indol ait été découvert par Baeyer (3) en 1868 et qu'il ait été trouvé par Brieger (4) en 1877 dans les matières fécales de l'homme, le problème de la toxicité de l'indol attend toujours sa solution.

Un examen, même superficiel, de la bibliographie nous montre que les mêmes documents cliniques et expérimentaux ont donné naissance à des opinions radicalement contradictoires : les uns affirment, les autres nient la toxicité de l'indol; les deux opinions s'appuient sur les résultats obtenus dans l'étude de l'action aiguë de ce produit.

Herter (5) a observé chez des animaux à sang chaud, après l'injection intraveineuse de 50-100 cent. cubes et plus d'indol à 0,1 p. 100, les phénomènes suivants : une influence toxique sur le système nerveux, un affaiblissement de l'activité du cœur et des organes de respiration, un rétrécissement notable des pupilles, des convulsions cloniques irrégulières et un affaiblissement de la sensibilité réflexe. Chez l'homme qui recevait par voie buccale 0,025-2 grammes d'indol par jour, le même auteur



a constaté un état un peu agité pendant le sommeil, du mal de tête, des phénomènes accentués de faiblesse, des symptômes de neurasthénie, sans autres symptômes d'empoisonnement. L'auteur croit pouvoir tirer de ce fait la conclusion que les symptômes prodromaux de la neurasthénie peuvent avoir pour cause l'intoxication par l'indol de provenance intestinale.

Les observations faites sur des aliénés ont amené Lewis C. Bruce (6) à la conclusion qu'il existe un lien entre l'abondance de l'indoxyle dans l'urine et les états de dépression, et qu'il faut considérer l'indoxyle comme la cause principale de l'aliénation mentale.

Pardo (7), qui a observé 118 cas d'aliénation mentale, n'est pas aussi catégorique que l'auteur précédent, mais il croit que l'indol peut avoir une influence sur les troubles mentaux.

Cette hypothèse a cependant aussi des adversaires. Omorokoff (8), en se basant sur des documents cliniques, arrive à la conclusion que « l'indoxyle ne fait qu'accompagner les maladies mentales, surtout dans les psychoses dépressives et maniacales » et « qu'il n'y a pas de relation causale entre l'indoxyle et les troubles mentaux; il n'y a qu'un parallélisme ».

Ch. Hervieux (9), dans des expériences sur des animaux divers, surtout sur des chiens, faisait ingérer à ces animaux 2, 3 et même 5 grammes d'indol; n'ayant pas constaté de phénomènes d'intoxication, l'auteur dit que ces expériences « démontrent d'une façon absolue que non seulement l'indol et le scatol, mais aussi les autres composés de la même série sont dépourvus de toxicité ».

Baumann et Brieger (10) ont fait ingérer à un chien de 24 kilogrammes, en cinq jours, 18 grammes d'indol, sans avoir provoqué un seul phénomène d'empoisonnement, tandis que, dans l'expérience de Nencki (11), 2 grammes ingérés ont provoqué chez un chien de l'hématurie et de la diarrhée.

Une injection sous-cutanée de 1,5-2 grammes d'indol provoque, d'après Rovighi (12), la mort des lapins; 1 gr. suffit pour le cobaye. La mort est précédée par les phénomènes suivants : somnolence, rétention de l'urine et des matières, affaiblissement de l'activité du cœur et hypothermie.

Ces expériences plaident contre l'opinion de Ch. Hervieux (9); elles montrent que de grandes doses d'indol sont, non seu-

lement toxiques, mais capables même de tuer des animaux de laboratoire.

Kukula (13) ne veut pas tirer des travaux cités cette conclusion, qu'imposent les expériences, et affirme qu'en cas d'intoxication intestinale l'indol ne joue aucun rôle (*dass das Indol bei Autointoxicationen infolge von Ileus keine Rolle spielt*). Porcher et Hervieux (14) ne font que répéter sous une autre forme l'opinion de Kukula lorsqu'ils affirment que « l'indol et le scatol ne doivent pas être compris parmi les facteurs de la toxicité des produits de la digestion intestinale » ; les auteurs se basent sur les expériences dans lesquelles les animaux supportaient bien l'indol introduit par voie buccale à des doses de 1 gr. 2 et 2 gr. 5. Ch. Hervieux (16) arrive ainsi à la conclusion que « l'indol est le témoin de la formation des produits toxiques développés au cours de putréfactions ».

Telles étaient les opinions sur la toxicité de l'indol et des autres dérivés de la série aromatique qui dominaient dans la science presque jusqu'à ces derniers jours, lorsque Metchnikoff, dans son travail : « Poisons intestinaux et scléroses » (*Ann. de l'Institut Pasteur*, octobre 1910), a jeté une lumière nouvelle sur ce problème.

D'après Metchnikoff, il s'agit de savoir si les substances de la série aromatique, élaborées en quantités minimales par la flore microbienne, ne peuvent pas occasionner une intoxication chronique qui ne se manifeste pas par des phénomènes visibles. C'est de ce point de vue qu'il faut aborder l'étude expérimentale du problème. « Etant donné que les bactéries intestinales ne produisent, en somme, que de petites doses de corps de la série aromatique, dit Metchnikoff, leur influence sur l'organisme ne pourrait se manifester que sous forme d'intoxication chronique. »

Les expériences avec le paracrésol, faites sur des lapins, amènent Metchnikoff à la conclusion « que les phénols, en cumulant leur action pendant plusieurs mois, sont réellement capables de provoquer l'artériosclérose chez le lapin ». Dans ces expériences, dans lesquelles 36 lapins reçurent par voie buccale 0,04 grammes de paracrésol en solution aqueuse durant une période de un à quatre mois, 22 (61 p. 100) ont présenté



des plaques athéromateuses, avec dépôt calcaire dans la tunique moyenne dans la plupart des cas.

Si, dans les expériences analogues, faites sur des cobayes, on n'a pas constaté d'altérations dans l'aorte, les coupes du foie montraient d'une façon indiscutable les premières phases des foyers de cirrhose. Des foyers analogues ont été constatés dans le foie d'un singe; cet animal présentait aussi de la rigidité et de l'épaississement des vaisseaux ainsi que de la sclérose des artères rénales. Dans le même travail, Metchnikoff (15) résume aussi les résultats des expériences du regretté Ohkoubo (1), qui a étudié dans son laboratoire l'action de l'indol et du scatol. D'après Ohkoubo, l'indol provoque chez les lapins une dégénérescence athéromateuse des parois de l'aorte, une infiltration des espaces péri-vasculaires par des cellules mononucléaires, avec une hypertrophie consécutive du tissu fibreux dans le foie du cobaye, et les mêmes changements moins accentués dans les reins. Tous ces résultats amènent Metchnikoff à la conclusion suivante: « On ne peut plus mettre en doute ce fait fondamental que de petites doses de paracrésol et d'indol, accumulant leur action sur l'organisme pendant un temps plus ou moins long, sont capables d'amener des lésions chroniques se traduisant par des phénomènes de sclérose. Ce sont précisément les lésions que l'on rencontre si fréquemment dans la vieillesse. »

De ce nouveau point de vue, l'étude de l'action des substances de la série aromatique prend un intérêt considérable, parce que la toxicité de ces substances peut, non seulement élucider le problème de la vieillesse et les changements intimes opérés dans les tissus d'un âge avancé, mais jeter aussi une lumière nouvelle sur l'étiologie de l'artériosclérose, cet important problème qui attend encore son explication complète.

Ayant abordé, sur la proposition de Metchnikoff, l'étude expérimentale du rôle de l'indol dans la sclérose, nous devons aussi tenir compte de son action toxique aiguë. Il fallait, d'un côté, fixer une dose considérablement inférieure à la dose toxique qui provoque les phénomènes visibles de l'intoxica-

(1) Le travail de Ohkoubo n'a pu être publié parce qu'il n'a pas laissé de manuscrit.

tion; d'un autre côté, il fallait connaître les symptômes de l'intoxication aiguë afin de pouvoir, au cours des expériences de longue durée avec de petites doses, exclure les phénomènes toxiques.

Citons quelques exemples parmi les expériences que nous avons répétées plusieurs fois sur des cobayes; nous avons fait des injections intrapéritonéales et sous-cutanées, l'indol a été aussi introduit par voie buccale.

Un cobaye de 660 grammes reçoit une injection intrapéritonéale de 0 gr. 25 d'indol dissout dans 1,5 cent. cube d'huile d'olive. 3-5 minutes après l'injection, on observe une trépidation par secousses de tout le corps, ensuite une trépidation périodique de groupes musculaires isolés et une faiblesse du train postérieur. 15-20 minutes après, la trépidation du corps ne s'interrompt plus, la parésie des pattes postérieures s'accroît, l'animal les traîne dans ses déplacements, il tombe sur le côté et conserve avec difficulté l'assiette normale. Bientôt il tombe et ne peut plus se relever. La trépidation ininterrompue devient toujours plus forte; de temps en temps, il y a des convulsions; en général, cette crise fait l'impression d'un fort frisson ininterrompu de fièvre. L'activité du cœur et des organes respiratoires se ralentit. La température rectale, qui était, avant le commencement de l'expérience, de 38°3, tombe une heure après jusqu'à 36°8 centigrades. Deux heures après, la trépidation et les convulsions deviennent peu à peu plus faibles; la paralysie de toutes les extrémités persiste; la piqure de la peau ne provoque pas de réaction; absence complète du réflexe oculaire; on entend à peine le battement du cœur; la respiration est superficielle; enfin, l'animal tombe dans un coma complet. Cette crise d'intoxication aiguë a duré trois heures et demie et a entraîné la mort. La rigidité cadavérique ne s'est pas fait attendre longtemps.

*Autopsie.* — Les vaisseaux sont remplis de sang; celui-ci est fluide, foncé et rougit à l'air; le cœur est fortement dilaté par le sang non coagulé. Dans le péritoine, il y a une petite quantité d'huile. Celle-ci, recueillie par une pipette et mélangée avec de l'eau physiologique, a donné, avec le réactif d'Ehrlich (p. diméthylaminobenzaldéhyde), la réaction de l'indol d'une façon très nette.

Il faut encore indiquer que, dans toutes les méthodes de détermination de la dose toxique aiguë, l'indol a été dissout dans l'huile et que les symptômes de l'empoisonnement et les résultats de l'autopsie étaient toujours analogues à ceux que nous venons de décrire; les résultats essentiels de toutes les autres expériences sont indiqués dans le tableau ci-dessous.

Ajoutons encore que la crise d'intoxication n'entraîne pas



toujours la mort; dans ce cas, les phénomènes d'intoxication, après avoir atteint le maximum, deviennent peu à peu plus faibles, la température remonte, les battements du cœur et la respiration reprennent leur rythme habituel, et l'animal, après avoir fait quelques essais, se lève et se jette sur la nourriture.

Chez le cobaye 4, à l'endroit de l'injection, le tissu sous-cutané était gonflé et imbibé d'huile contenant l'indol (constaté avec le réactif d'Ehrlich).

NUMÉROS des cobayes.	POIDS des cobayes en grammes.	MÉTHODE de l'introduc- tion de l'indol.	QUANTITÉ D'INDOL introduite.	LA CRISE commence dans un délai de :	DURÉE de la crise.	ISSUE de la crise.	DOSE MORTELLE sur cobayes du poids de 100 grammes.	DOSE toxique provoquant des phénomènes visibles sur cobayes du poids de 100 gr.
1	630	Intrapér.	0,25	3-5 min.	34 m. 1/2	Mort.	0,038	
2	330	Id.	0,5	Id.	15 min.	Id.	0,16	
3	310	Id.	0,05	Id.	14 h. 1/2	Guérison.		0,016
4	350	Sous-cut.	0,5	28-30 min.	6 heures.	Mort.	0,15	
5	300	Id.	0,2	30 min.	2 heures.	Guérison.		0,07
6	130	<i>per os.</i>	0,5	1 h. 1/2	3 h. 1/2	Mort.	0,38	
7	120	Id.	0,25	1 h. 3/4 après l'intro- duction de l'indol.	2 heures.	Guérison.		0,19

A l'autopsie du cobaye 6, plusieurs hémorragies de la grandeur d'un grain de lentille ont été trouvées; la couche supérieure épithéliale de la muqueuse de l'estomac est d'une couleur blanc grisâtre opaque et se détache facilement. Le contenu de l'estomac et de l'intestin dégageait une forte odeur d'indol.

Dans les séries d'expériences 6 et 7 on a pris, pour la réaction d'Ehrlich, le sérum et le sang de la veine jugulaire pendant le paroxysme de la crise; le résultat était positif pour les doses mortelles et négatif pour les doses visiblement toxiques.

Nous avons indiqué dans notre tableau les doses mortelles et toxiques; mais si nous examinons les faits de plus près, la question se pose de savoir si nos chiffres correspondent exactement à la réalité. Nous avons vu, en effet, que l'huile que l'on trouve dans le tissu sous-cutané et dans le péritoine donne la réaction de l'indol; nous savons aussi que le contenu de l'estomac et des intestins des animaux auxquels on fait ingérer l'indol dégage une forte odeur d'indol. Supposons, en effet, que les phénomènes d'intoxication apparaissent lorsque l'intestin a absorbé  $a$  grammes d'indol. Nos expériences prouvent que les phénomènes d'intoxication apparaissent d'autant plus vite que l'indol est absorbé plus vite: dans le cas d'injection intrapéritonéale, ces phénomènes apparaissent presque aussitôt après l'injection; dans l'injection sous-cutanée, 15-20 minutes après; dans l'introduction par voie buccale, 1 h. 1/2-2 heures après; l'intervalle de 1 h. 1/2-2 heures dans le cas de l'absorption intestinale est évidemment nécessaire pour accumuler dans l'organisme la dose de  $a$  grammes, indispensable pour l'action toxique. Mais avant le commencement de la crise et pendant la crise, une partie de cette quantité hypothétique est éliminée sous forme de sulfates; c'est pourquoi il est évident que si la crise dure pendant un temps plus ou moins long, cette perte doit être remplacée aux dépens du surplus de l'indol introduit par voie buccale.

L'examen des faits cités nous mène ainsi à la conclusion que les doses indiquées dans notre tableau sont supérieures aux doses réellement toxiques.

Les résultats anatomo-pathologiques de l'intoxication aiguë seront communiqués plus tard.

Avant d'exposer les résultats des expériences sur l'intoxication chronique, nous voulons nous arrêter brièvement sur le but et les méthodes de nos recherches et sur la technique de nos expériences.

Le problème qui se posait, d'après les idées de Metchnikoff, était le suivant: quels changements s'accomplissent dans les tissus des différents organes, surtout dans l'aorte, si on introduit dans l'organisme animal de petites doses d'indol ne provoquant pas de phénomènes d'intoxication visibles? Afin d'imiter l'auto-intoxication naturelle de l'organisme, il fallait



introduire l'indol par voie buccale. Nous avons employé l'indol de « *Bad. Anilin u. Soda-Fabrik* ». Afin d'éliminer l'influence du dissolvant (de l'alcool, de l'éther, par exemple), nous avons pris comme dissolvant l'huile d'olive, comme l'ont déjà fait Ch. Hervieux (16) et Ohkoubou. On préparait la solution d'indol à 4 p. 100 *ex tempore*; chaque animal recevait 1 cent. cube de cette solution, c'est-à-dire 0 gr. 04 d'indol; on se servait de la seringue pour introduire l'indol dans la bouche, avec les précautions nécessaires.

Avant le commencement des expériences, on n'a pu, avec les réactions de Maillard ou d'Obermeyer, constater de traces d'indican dans l'urine.

Afin de ne pas interrompre le processus d'intoxication, il fallait introduire l'indol tous les jours, l'expérience nous ayant montré que la réaction sur l'indican, positive dans notre mode d'intoxication au bout de vingt-quatre heures, devient négative au bout de quarante-huit heures. Ce résultat concorde avec celui de E. Wang (17), qui a constaté, dans ses expériences sur le chien, que l'indol ajouté à la nourriture est complètement éliminé après vingt-quatre heures; d'après Grosser (18), il faut quarante-huit heures pour l'élimination complète. Nous ne voulons pas trancher ici cette question; disons seulement que si l'on fait ingérer l'indol tous les jours, la réaction de l'urine au point de vue de l'indican est nettement positive; malgré cela, on n'observe pas, au cours de l'expérience, de phénomènes d'intoxication tant soit peu manifestes.

On se servait pour l'examen microscopique des organes des animaux tués par le chloroforme ou saignés à blanc. On ensemait avec le sang du cœur et avec les organes des milieux de culture stériles; les organes étaient soumis à un examen histologique seulement dans les cas où le sang et les organes étaient tout à fait stériles et où il n'y avait pas d'anomalies anatomo-pathologiques macroscopiques.

Nous avons employé comme fixateurs, pour les fragments d'organes, le sublimé, le liquide de Bouin, l'acétone, etc.; l'inclusion dans la paraffine se faisait d'après les méthodes ordinaires. Nous nous sommes servi de l'hématéine-éosine et du colorant de Van Gieson pour la coloration des coupes;

pour la coloration des fibres élastiques, du mélange de chaux-argent nitrique, d'après Weigert.

Avant d'exposer les résultats obtenus dans nos expériences sur l'intoxication chronique, nous avons à mentionner les recherches que nous avons faites pour étudier la structure de l'aorte des cobayes normaux, non soumis au régime de l'indol. Les résultats de cette étude présentent un intérêt au point de vue du problème général de la sclérose physiologique de l'aorte chez les rongeurs. Ils nous serviront aussi de base pour juger les résultats obtenus dans les expériences sur l'intoxication chronique.

D'après l'opinion courante, le système vasculaire des cobayes, surtout l'aorte, montre une résistance tout à fait particulière; on affirme que ce système n'aurait pas à souffrir de l'action des poisons vasculaires et que l'athérome spontané ne se rencontrerait que dans des cas excessivement rares.

Weinberg (19) a examiné 236 cobayes et n'a constaté qu'un seul cas de dégénérescence athéromateuse des parois de l'aorte.

Nos études confirment d'un côté l'opinion citée sur la résistance de l'aorte chez le cobaye : l'examen macroscopique ne nous a jamais révélé de plaques athéromateuses ni d'autres anomalies dans les parois de ce vaisseau; mais, d'un autre côté, l'examen microscopique systématique de la portion ascendante de la crosse de l'aorte dans la région des valvules nous a donné des résultats qui ne plaident pas en faveur de la résistance particulière de l'aorte chez le cobaye.

Nous avons été amené à cette étude par les faits suivants :

M. Studzinski (20), qui travaillait en même temps que nous au laboratoire de Metchnikoff, a trouvé, après l'injection sous-cutanée de cultures vivantes du *B. coli*, durant une période de deux mois, plusieurs parties cartilagineuses près de la base de l'aorte (1). Bientôt après, nous avons aussi constaté des foyers cartilagineux chez un cobaye qui a été en expérience un mois et demi (0,04 grammes d'indol par jour). La durée de l'action de l'indol nous ayant paru trop courte pour attribuer à ce fac-

(1) M. Griasnow, qui a étudié l'influence du paracrésol sur l'artériosclérose, n'a pas encore publié ses résultats.



teur les changements constatés, nous avons entrepris l'examen systématique de l'aorte.

L'aorte, dans la région des valvules et un peu plus haut, ne présentait pas d'indications plaidant en faveur d'anomalies dans la paroi; ce n'est que dans des cas rares que le bord libre de la valvule montrait un épaissement d'aspect vitreux. C'est pourquoi il fallait faire des séries de coupes de toute cette partie de l'aorte, cette méthode seule permettant d'affirmer ou de nier avec certitude l'existence des altérations de la paroi.

Sur les premiers dix cobayes normaux, pesant 450-530 gr., 8 avaient des foyers cartilagineux dans la paroi de l'aorte. Cette constatation inattendue posait la question de savoir s'il ne s'agit pas ici d'un détail anatomique normal, question d'autant plus justifiée que les grands animaux ont, dans cette région, non seulement des cartilages, mais aussi des os. Le cartilage (*cartilago cordis*) se trouvant dans le cercle fibreux de l'orifice de l'aorte du cheval, devient osseux chez les vieux animaux; un cartilage semblable se trouve toujours chez le porc et pas toujours chez les carnivores; les animaux à cornes ont deux os dans le cœur (*ossa cordis*).

Une étude plus approfondie nous a fourni une réponse négative à la question posée. L'examen microscopique des séries de coupes transversales a montré que ces parties cartilagineuses ne sont pas réparties d'une façon régulière ni dans le plan transversal de l'aorte, ni le long de l'aorte (de la base de l'aorte jusqu'au bord supérieur libre des valvules). On trouve souvent des parties cartilagineuses, de forme arrondie ou en triangle aux angles arrondis, dans la conjonctive qui rattache les valvules à la paroi de l'aorte (Pl. I, fig. 4). Ces parties cartilagineuses se trouvent tantôt dans les trois attaches conjonctives simultanément, tantôt dans une ou deux de ces attaches; ces variations ne montrent aucune régularité ni sur les coupes de la même partie de l'aorte, ni sur les coupes des animaux différents. On trouve non moins souvent des foyers cartilagineux de forme ronde ou ovale dans la partie de la paroi de l'aorte comprise entre les lieux d'insertion des attaches des valvules (Pl. I, fig. 2-3); on n'a pas constaté de relation entre ces foyers et ceux qui se trouvent à la base des valvules. Ajoutons que les foyers ne sont pas localisés d'une façon déter-

minée dans les tuniques; ils se rencontrent seulement plus souvent dans la tunique moyenne que dans la tunique adventive.

Les foyers ovales ou ronds varient aussi dans leur grandeur, ce que l'on constate déjà en examinant l'épaisseur de la paroi de l'aorte; tantôt les tuniques intérieure et extérieure de l'aorte ne dépassent pas, quant à leur épaisseur, l'épaisseur normale de la paroi (Pl. VI, fig. 1), tantôt elles la dépassent légèrement (Pl. VI, fig. 2); tantôt la tunique moyenne avec l'intima s'épaississent fortement et envahissent en partie la lumière du vaisseau (Pl. VI, fig. 4). Les foyers cartilagineux sont tantôt isolés, tantôt réunis et imprègnent toute la paroi de l'aorte entre les attaches des valvules. Comme particularité, il faut citer un cas anormal où il y avait quatre valvules dans l'aorte : la cloison divisant la valvule moyenne a été fortement dilatée par les deux foyers qu'elle contenait; dans deux cas où la cartilagination de l'aorte était abondante, on a pu observer des figures de mitose des noyaux des cellules cartilagineuses.

Toutes les constatations précédentes démontrent suffisamment que les foyers cartilagineux ne peuvent pas être considérés comme un caractère anatomique normal.

En poursuivant l'examen de toute une série de coupes dans tous les détails, on peut faire la constatation suivante : dans un endroit quelconque de la paroi de l'aorte (principalement sur la tunique moyenne et sur la tunique adventive) apparaissent des cellules arrondies, à noyau rond, nettement délimité; en s'accumulant peu à peu entre les fibres élastiques, ces cellules forment des foyers arrondis; les espaces intercellulaires se colorent bien à l'hématéine; les cellules se trouvant au centre de ces foyers deviennent plus grandes et prennent la forme et l'aspect des cellules cartilagineuses typiques; tout le foyer prend l'aspect d'une partie cartilagineuse, les petites cellules rondes ne restent que sur la périphérie ou sur le tissu avoisinant (Pl. VI, fig. 3).

Nous avons ainsi, dans les cas examinés, un processus pathologique; une sclérose de l'aorte *sui generis*, se manifestant par un processus de cartilagination de l'aorte, soit en foyers, soit sous une autre forme.

Nous disons processus *sui generis*, parce que la cartilagina-



tion de l'aorte chez l'homme et chez certains animaux ne se rencontre pas avec cette constance, qui est caractéristique pour le cobaye, et, comme nous le verrons plus tard, aussi pour d'autres rongeurs.

Si développé qu'il soit, le processus de cartilagination ne frappe qu'avec une rareté extrême la tunique adventive; nous n'avons trouvé qu'une seule fois un faible épaissement de l'intima (Pl. VI, fig. 3).

Nous avons examiné en tout :

NOMBRE de cobayes examinés.	POIDS OU AGE	NOMBRE DE CAS de cartilagination.	POURCENTAGE
4	embryons quelques jours avant la nais- sance.	0	0
4	2 semaines.	0	0
6	120-220 grammes.	0	0
10	250-300 —	3	30 p. 100
8	350-450 —	4	60 —
10	450-530 —	8	80 —
6	545-630 —	6	100 —
6	650-740 —	6	100 —
34		27	50 p. 100

Il est plus juste, lorsqu'on fait la totalisation, de ne compter que les cobayes ayant un poids de 250 grammes et plus; on a alors le résultat suivant : 27 cas de cartilagination sur 40 animaux examinés, ou 67,5 p. 100.

Nous ne voulons pas, étant donné le nombre encore peu considérable des cas étudiés, établir une loi de fréquence de la cartilagination chez les cobayes normaux, mais nous pouvons certainement conclure que la dégénérescence cartilagineuse est très fréquente chez les cobayes et que sa fréquence augmente avec l'augmentation du poids des animaux.

Le poids dépendant surtout de l'âge, nous avons le droit d'affirmer que le processus pathologique constaté peut être considéré comme une maladie de l'âge. S'il en est ainsi, on pouvait supposer *a priori* qu'avec l'augmentation de l'âge, les foyers cartilagineux peuvent subir des processus de dégénération

avec le dépôt consécutif des sels calcaires. Nous n'avons constaté que dans deux cas (2 cobayes pesant 610 et 715 gr.) les phases primaires du dépôt des sels calcaires dans les espaces intercellulaires des foyers cartilagineux.

Quelle est l'étiologie de cette maladie?

Il est difficile de donner actuellement une réponse catégorique. Si l'étiologie de l'artériosclérose chez l'homme n'est pas encore complètement élucidée, ce problème demande une étude encore plus détaillée lorsqu'il s'agit des animaux. Tous les facteurs de l'artériosclérose chez l'homme, comme la syphilis, l'alcoolisme, l'empoisonnement par la nicotine, par les sels de plomb, etc., ne peuvent évidemment jouer aucun rôle chez nos cobayes. Il faut aussi éliminer les processus infectieux, l'autopsie ne nous en ayant pas révélé de traces. Cela posé, il ne reste à notre avis qu'à interpréter les processus décrits dans l'aorte du cobaye, d'après les idées de Metchnikoff; il faut chercher le moment étiologique dans l'autointoxication intestinale de provenance microbienne, dont les effets désastreux deviennent plus graves à mesure que l'animal vieillit et peuvent provoquer une série de changements caractéristiques pour l'usure de l'organisme.

Nous avons tenté d'abord de prouver notre supposition d'une façon indirecte. Les conditions de digestion qui entraînent habituellement un processus de putréfaction intense dans l'intestin étant les mêmes chez tous les rongeurs, et l'autointoxication intestinale étant considérée comme le moment étiologique de la sclérose du cobaye, on devait aussi constater le même processus pathologique chez les autres rongeurs.

L'examen microscopique de l'aorte des souris blanches nous a en effet révélé un processus de cartilagination analogue à celui que nous avons décrit chez les cobayes.

Mais, peut-on nous objecter, ce sont les conditions spéciales de la vie en captivité qui provoquent l'anomalie pathologique dans les vaisseaux. C'est pourquoi nous avons étudié aussi la structure de l'aorte chez des animaux vivant en liberté, tels que des rats d'égouts; et nous avons trouvé chez de vieux rats le même processus de cartilagination dans la paroi de l'aorte, dans la région des valvules.

Voici maintenant les résultats des expériences d'intoxication



chronique des singes et des cobayes avec l'indol. De trois singes, un seulement a supporté l'expérience jusqu'au bout, c'était un *Macacus Rhesus* femelle; des deux autres, l'un est mort de tuberculose pulmonaire, l'autre d'une inflammation aiguë de l'intestin. L'animal qui nous intéresse était jeune et pesait 2.200 grammes. Durant huit mois, il a reçu tous les jours, par voie buccale, 0,04 grammes d'indol dissous dans l'huile d'olive (en tout, 10 gr. 4 d'indol). La réaction de l'indican était faite presque tous les jours, le résultat était nettement positif. On n'a pas observé de phénomènes d'intoxication visibles pendant la durée de l'expérience. Lorsque, après huit mois, l'animal a été sacrifié (saigné à blanc), il pesait 3.100, il avait donc augmenté de 900 grammes. L'autopsie n'a pas révélé de changements pathologiques. Les milieux de culture, ensemencés avec le sang et les organes, sont restés stériles. L'examen microscopique a donné les résultats suivants :

*Aorte.* — Sur les coupes transversales de la base de l'aorte, autour des *vasa vasorum*, des infiltrations de cellules rondes; infiltrations semblables dans les espaces entre les fibres musculaires du cœur, en contiguïté avec l'adventice de la base de l'aorte.

*Foie.* — Sur les coupes, une infiltration faible de petites cellules autour des canaux biliaires et des vaisseaux sanguins.

*Reins.* — Chaque coupe montre d'une façon nette des phénomènes de néphrite interstitielle. En plusieurs endroits de la couche corticale ainsi que de la couche médullaire, il y a des foyers considérables formés par de petites cellules rondes; les coupes transversales des tubes urinifères apparaissent comme des îlots sur le fond de ces infiltrations (Pl. VII, fig. 1); des infiltrations semblables enveloppent aussi les glomérules, tantôt de tous côtés (Pl. VII, fig. 3), tantôt d'un côté seulement (Pl. VII, fig. 2). Mais ici nous n'avons pas seulement devant nous les phases primaires de la sclérose, les coupes montrent toutes les phases, depuis l'infiltration par de petites cellules rondes jusqu'à la formation du tissu conjonctif; celui-ci peut former des bandes assez larges qui entourent les glomérules en partie fortement ratatinés, en partie détruits (Pl. VIII, fig. 1). On constate les mêmes phénomènes autour des tubes urinifères.

Autour des vaisseaux, infiltration non moins abondante par

de petites cellules rondes (Pl. VIII, fig. 2), avec prolifération consécutive du tissu conjonctif en contiguïté avec les vaisseaux.

*Capsules surrénales.* — Les coupes transversales de la capsule montrent d'une façon très nette une forte prolifération du tissu conjonctif dans la substance corticale ; dans la couche réticulaire, on constate une grande quantité de foyers calcaires. Le tissu conjonctif se dirige, sous forme de bandes larges, vers la périphérie de la glande, les bandes deviennent de moins en moins larges à mesure qu'elles se rapprochent de la périphérie ; prenant naissance presque sur la limite de la substance médullaire et de la couche réticulaire de la substance corticale, elles occupent presque les trois quarts de cette substance. Par endroits, prolifération du tissu conjonctif. Des lacets de tissu conjonctif se détachent de nombreux petits îlots de cellules fortement déformées, à noyaux picnotiques (Pl. IX, fig. 1).

On pouvait compter sur chaque coupe jusqu'à vingt parties calcaires, et même davantage, de forme arrondie ou irrégulière avec une disposition concentrique de couches de chaux ; la répartition en couches concentriques ne présente pas la même régularité dans tous les foyers. Sur les coupes décalcifiées, la couche périphérique de ces foyers est formée par des fibres du tissu conjonctif montrant une dégénérescence hyaline et se dirigeant vers le centre. On trouve quelquefois, dans le centre de ces foyers, des restes de cellules.

*Cerveau.* — Légère prolifération des cellules névrogliques, et neuronophagie nette. M. Wladytchko (21) a observé le même phénomène chez le cobaye ayant subi l'intoxication par de petites doses d'indol.

Une intoxication par de petites doses d'indol, d'une durée de 8 mois, a provoqué ainsi chez le singe des changements ayant un caractère scléreux : dans le cerveau, dans le foie, dans l'aorte, les phases primaires de la sclérose ; dans les reins et les capsules surrénales, les phases primaires avec la prolifération consécutive du tissu conjonctif.

Ces phénomènes peuvent-ils être expliqués par coïncidence accidentelle, ou par la vie en captivité ?

Nous reviendrons sur la première objection, lorsque nous aurons à discuter les résultats de nos expériences sur le cobaye ; la seconde objection tombe parce qu'un singe de la même espèce



et du même poids à peu près (2.850 gr.), tenu en cage durant presque la même période de 8 mois, ne nous a révélé, à l'examen histologique, pas même des traces de phénomènes semblables.

Les expériences sur l'intoxication chronique du cobaye nous ont donné des résultats non moins intéressants. De 25 cobayes auxquels on faisait ingérer tous les jours 0 gr. 04 d'indol, 14 seulement peuvent compter pour nos résultats ; les autres n'ont pas été pris en considération pour diverses causes : six ont péri accidentellement ; chez un cobaye sacrifié, le sang du cœur n'a pas été stérile ; dans deux cas où les animaux furent sacrifiés 4 mois 1/2 et 2 mois après le commencement des expériences, la durée de l'intoxication était trop courte.

Avant le commencement de l'expérience, le poids des 12 cobayes dont nous tenons compte était de 360-480 grammes ; l'augmentation ou la diminution du poids à la fin de l'expérience n'a pas dépassé 70 grammes dans tous ces cas. Deux cobayes mis au monde par une femelle soumise à nos expériences ont été pris pour le régime à l'indol lorsqu'ils n'avaient que deux semaines ; après la période de 8 mois d'intoxication chronique (0 gr. 04 d'indol par voie buccale tous les jours), ils ne pesaient que 210 et 230 grammes. La durée de l'expérience dans les autres cas a été de 4 à 10 mois (2 cobayes, 4 mois ; 2 — 4 mois 1/2 ; 2 —, 5 mois ; 2 —, 6 mois ; 1 —, 6 mois 1/2 ; 1 —, 7 mois 1/2 ; 2 —, 8 mois ; 2 —, 10 mois 1/2). On n'a pas observé de phénomènes d'intoxication visibles pendant la durée de l'expérience. A l'autopsie des cobayes sacrifiés (chloroformés ou saignés), pas de changements pathologiques ; des milieux de cultureensemencés avec ce sang sont restés stériles.

L'examen microscopique des séries de coupes a montré les changements histologiques suivants :

*Aorte.* — Sur les coupes transversales de la portion ascendante de la crosse de l'aorte dans la région des valvules, autour des *vasa vasorum* passant dans le tissu adventice, il y a des infiltrations de petites cellules rondes, mononucléaires ; les polynucléaires sont excessivement rares ; par endroits, des foyers de tissu conjonctif couvrent complètement les fibres élastiques dans la paroi. On trouve aussi dans la tunique moyenne des foyers allongés de dégénérescence hyaline, ayant

la forme d'un ovale comprimé, ou de forme irrégulière; la plupart ou la moitié de ces foyers sont imprégnés de sels calcaires; des restes de cellules sont disséminés dans les parties non imprégnées de sels calcaires (Pl. X, fig. 1, cobaye 15, 5 mois sous l'expérience). Des foyers semblables, prenant naissance au bord extérieur de la paroi, traversent obliquement la tunique moyenne, se heurtant presque à l'intima (Pl. X, fig. 2, cobaye 3, 6 mois en expérience) ou se localisent dans ce bord de la paroi (Pl. XI, fig. *a* et *c*). Les foyers calcaires présentent des variations sensibles dans leur grandeur. On le voit dans les figures *c*, *a*, *e* et *d*, Pl. XI.

Ces foyers, comme nous avons pu nous en convaincre par l'examen d'une série de coupes, ne présentent pas les caractères d'une dégénérescence hyaline des foyers cartilagineux avec dépôt consécutif des sels calcaires; nous n'avons pu trouver ces caractères dans les restes des cellules. Nous avons constaté des foyers semblables dans quatre cas. On trouve encore des foyers calcifiés dont la périphérie n'a pas de parties de dégénérescence hyaline non imprégnée. Dans ces dépôts calcaires, on peut quelquefois constater des restes de cellules à aspect cartilagineux; lorsqu'un foyer semblable se trouve à côté des foyers cartilagineux, on est forcément amené à supposer que le foyer calcaire présente une dégénérescence calcaire du foyer cartilagineux (Pl. X, fig. 3 *a*, cobaye 1, 6 mois 1/2 sous l'expérience). Deux cobayes ont présenté des foyers semblables. Enfin, dans deux cas, nous avons eu simultanément les foyers calcaires de ces deux aspects différents (Pl. XI). Si avancée qu'elle soit, cette dégénérescence calcaire n'entraîne jamais l'épaississement de l'intima.

De 14, ou, pour mieux dire, de 12 cobayes (deux aortes des cobayes ayant subi l'expérience pendant 10 mois ont été malheureusement égarées), 8 présentaient des changements semblables de l'aorte. Les deux jeunes cobayes (cf. p. 417) ont présenté des foyers avec une forte cartilagination de la paroi de l'aorte dans la région des valvules.

*Reins.* — Des foyers, nettement déterminés, d'infiltration par des cellules rondes mononucléaires ont été trouvés dans les coupes de reins de tous les cobayes; les polynucléaires sont excessivement rares; infiltrations semblables entre les tubes



urinifères autour des glomérules et des vaisseaux ; dans la plupart des cas, prolifération consécutive du tissu conjonctif et destruction des glomérules. On voit ainsi que ce sont les mêmes phénomènes qui ont été constatés chez le singe ; c'est pourquoi nous pouvons nous rapporter, quant à l'aspect microscopique, aux figures données pour le singe.

Nous avons aussi constaté presque dans tous les cas des dépôts calcaires dans les tubes urinifères. Ces dépôts calcaires coïncidaient avec la calcification de la paroi de l'aorte. Ayant constaté cette coïncidence, nous nous sommes mis à préparer, par un procédé rapide, des coupes de reins (fixation dans l'acétone 1 heure, xylol 10-15 minutes ; paraffine 56 degrés, 1 heure, etc.) ; les dépôts calcaires dans les tubes une fois constatés, nous étions sûrs de trouver les foyers calcifiés dans l'aorte. Cette supposition ne s'est pas confirmée dans deux cas se rapportant aux aortes de jeunes cobayes ; ceux-ci, comme on l'a indiqué plus haut, ne présentaient que des foyers cartilagineux dans leurs aortes.

*Foie.* — Les coupes du foie présentent la phase primaire de la cirrhose sous forme d'une infiltration de petites cellules autour des vaisseaux biliaires et sanguins ; ce phénomène se manifeste chez tous les cobayes d'une manière légère.

La constance avec laquelle ces changements pathologiques se rencontrent chez presque tous les animaux soumis à l'expérience, doit exclure toute supposition d'une coïncidence accidentelle. L'examen de cinq cobayes de contrôle, ayant subi le régime de captivité durant la même période de 8 mois, ne nous a pas révélé de processus pathologiques analogues à ceux que nous avons décrits ; la captivité, comme on le voit, ne peut pas être considérée comme la cause de ces phénomènes.

L'intoxication chronique par l'indol a donc provoqué chez le cobaye les phénomènes caractéristiques de la sclérose : la sclérose typique des reins, la phase primaire de cirrhose du foie et l'athérome spécifique de l'aorte dans la région des valvules. L'athérome se manifestant chez le cobaye par le processus de dégénérescence hyaline (sous forme de foyers) de la paroi de l'aorte, avec le dépôt consécutif de sels calcaires, a été constatée dans 8 cas sur 12, tandis que, parmi les 52 cobayes normaux examinés par nous, deux seulement présentaient les

phases primaires de calcification des foyers cartilagineux, mais ces deux animaux étaient d'un poids très élevé (610 et 715 grammes). Ces deux cas de dégénérescence calcaire de l'aorte des cobayes normaux renforcent notre opinion, que l'athérome de l'aorte constatée chez le cobaye dans nos expériences, est due à l'intoxication chronique par l'indol, introduit en petites doses par voie buccale; c'est pourquoi l'indol doit être compris, non seulement parmi les poisons intestinaux qui occasionnent les processus caractéristiques de la vieillesse, mais aussi parmi les substances qui provoquent les processus pathologiques dans la paroi de l'aorte.

Loin de nous la pensée de considérer les résultats de nos recherches sur les effets de l'intoxication chronique par l'indol comme la solution intégrale de ce problème; mais nous croyons que notre travail a donné des résultats encourageants pour le résoudre et que ces résultats s'accordent avec la conclusion de Metchnikoff, citée plus haut (p. 405).

Nous pouvons résumer les résultats de notre travail de la manière suivante :

1° Des doses plus ou moins grandes d'indol provoquent chez le cobaye des crises d'intoxication aiguë se manifestant par des phénomènes neuro-musculaires pouvant avoir une issue mortelle, mais aussi se terminer par la guérison; l'issue fatale dépend de la dose, le mode d'introduction de l'indol ne jouant ici aucun rôle.

2° Contrairement à l'opinion courante sur la résistance particulière naturelle de l'aorte du cobaye, la portion ascendante de la crosse de l'aorte dans la région des valvules subit souvent, spontanément, une sclérose spécifique. Ce processus peut se manifester par la dégénérescence cartilagineuse sous des formes diverses, suivie, dans des cas très rares, de calcification.

3° On peut considérer ce processus comme une maladie de l'âge.

4° On trouve un processus semblable de dégénérescence cartilagineuse chez la souris blanche et chez le rat d'égout.

5° L'introduction de petites doses d'indol (0 gr. 04 tous les jours, par voie buccale) durant une période assez longue pro-



voque chez le cobaye une dégénérescence athéromateuse de la paroi de l'aorte dans la région des valvules.

6° On constate aussi, dans ce cas, des processus chroniques interstitiels dans des organes différents : la sclérose des reins (singe et cobaye), les phases primaires de la cirrhose du foie (singe, cobaye), la sclérose de la capsule surrénale (singe), les phases primaires de la sclérose de l'aorte et du cerveau.

En terminant ce travail, nous accomplissons un agréable devoir en adressant nos remerciements à M. Metchnikoff, pour le sujet de recherches qu'il a bien voulu nous proposer et pour l'intérêt qu'il nous a témoigné en suivant de près notre travail dans tous ses détails.

## BIBLIOGRAPHIE

1

1. E. METCHNIKOFF. — *Etudes sur la nature humaine*, 1903.
2. E. METCHNIKOFF. — *Essais optimistes*, 1907.
3. BAEYER. — Ueber die Reduction des Indigoblaus (*Berichte*, 1868, 1, 17).
4. BRIEGER. — Ueber die flüchtigen Bestandtheile der menschlichen Excremente (*Berichte*, 1877, 10, 1029).
5. HERTER. — An Experimental Study of the toxic proprieties of indol. (*Medic. Journal*, 1898).
6. LEWIS C. BRUCE. — The Clinical Significance of indoxyl in the urine (*The Journal of ment. Science*, 1906, t. LII, p. 218).
7. PARDO (G.). — Ricerche sull' indossiluria nelle malattie di mente (*Rivist. spiriment. di Freniatr.*, vol. XXXIII, p. 275).
8. OMOROKOFF. — Sur l'origine de l'indicanurie dans les maladies mentales (*Revue de Psychiatrie et de Neurologie*, 1909) (russe).
9. CH. HERVIEUX. — Sur la prétendue toxicité des corps du groupe de l'indol (*Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1907, p. 895, séance du 18 mai).
10. BAUMANN et BRIEGER. — Ueber die Indoxylschwefel-Säure, das Indican des Harns (*Zeitschr. für physiol. Chem.*, 1879, p. 253, v. 3).
11. NENCKI. — Zur Geschichte des Indols und der Fäulnisprozesse im thierischen Organismus (*Berichte*, 1876).
12. ROVIGHI. — *Arch. di farmacologia terapeutica*, 1996, IV, 3.
13. KUKULA. — Untersuchungen über Autointoxicationen (*Arch. f. klinisch. Chirurg.*, 1901, 36).
14. CH. PORCHER et HERVIEUX. — Recherches expérimentales sur les chromogènes urinaires du groupe de l'indol (*Journ. de Physiologie et de Pathol. générale*, 1906, p. 841).
15. E. METCHNIKOFF. — Etudes sur la flore intestinale. Deuxième mémoire. Poisons intestinaux et scléroses (*Ann. de l'Institut Pasteur*, 1910, t. XXIV).
16. CH. HERVIEUX. — Recherches biochimiques sur l'indol et l'acide glycuronique (*Thèse*, 1908, Lyon).
17. E. WANG. — Fütterungsversuche mit Indol (*Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 1899, t. XXVII, p. 557-575).
18. R. GROSSER. — Ueber das Verhalten von zugeführten Indol und Scatol im Organismus (*Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 1905, t. XLIV, p. 320-324).

19. WEINBERG. — *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1908, p. 361, séance du 5 décembre.

20. STODZINSKI. — Contribution à l'action du coli-bacillé sur l'organisme animal (*Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1911, p. 255, 24 février).

21. WLADYTCHKO. — Sur l'influence de certains poisons intestinaux sur le système central nerveux (*Rousski Vrach*, 1911, 39; p. 1493-94) (russe).

B. DANILEWSKY. — Ueber die Wirkung des Indols auf das Froschherz (*Pflügers Arch. f. die gesamt. Physiologie*, 1908, p. 361-376).

## LÉGENDE DES PLANCHES VI À XI

Les contours et les détails des coupes ont été dessinés à l'aide de l'appareil de Zeiss. Nous nous sommes servi du microscope de Leitz (Obj. 3 et 6. Ocul. 4).

PL. VI. — Coupes transversales des parois de l'aorte dans la région des valvules. Cobayes normaux.

FIG. 1. — Foyer cartilagineux dans la région de l'insertion des attaches qui rattachent les valvules à la paroi de l'aorte.

La grandeur du foyer n'a pas d'influence sur l'épaisseur de la paroi de l'aorte.

FIG. 2. — Un foyer semblable dans la paroi de l'aorte entre les attaches des valvules (celles-ci ne figurent pas sur le dessin). La paroi de l'aorte est un peu plus épaisse du côté de l'adventice et de l'intima, cet épaississement est dû au diamètre transversal du foyer.

FIG. 3. — Un foyer semblable de forme arrondie a dilaté fortement la paroi de l'aorte et a poussé en avant sa partie intérieure. Le centre du foyer est occupé par des cellules cartilagineuses typiques; dans la périphérie, une couche considérable des cellules arrondies de forme de passage.

FIG. 4. — Anomalie : 4 valvules. Dans la cloison divisant la valvule moyenne en deux, on voit distinctement des foyers cartilagineux qui ont dilaté cette cloison.

PL. VII. — Coupes transversales du rein de singe (8 mois en expérience).

FIG. 1. — Un grand foyer d'infiltration par de petites cellules. Sur le fond de cette infiltration, les coupes transversales des tubes urinifères apparaissent comme des îlots.

FIG. 2. — Trois quarts de la périphérie du glomérule sont occupés par l'infiltration.

FIG. 3. — Tout le glomérule est entouré par l'infiltration.

PL. VIII. — Coupes transversales du rein du même singe, colorées d'après Van Gieson.

FIG. 1. — Les glomérules sont ratatinés et sont enveloppés par une couche considérable du tissu conjonctif; deux (a et b) sont presque complètement détruits.

FIG. 2. — Image nette de l'infiltration périvasculaire par de petites cellules a, glomérule détruit.

PL. IX. — Coupe transversale de la capsule surrénale du même singe.

FIG. 1. — Forte prolifération du tissu conjonctif dans la substance corticale; cette prolifération a la forme d'un triangle irrégulier, dont la base



touche presque la substance médullaire et dont le sommet est dirigé vers la périphérie. Des bandes de tissu conjonctif découpent des groupes arrondis de cellules de la glande, le tissu conjonctif couvre peu à peu toutes les cellules. On voit des cellules à noyaux picnotiques. On voit aussi sept parties calcifiées, avec un centre plus clair et une périphérie fortement colorée.

Pl. X. — Coupes transversales des aortes dans la région des valvules des cobayes (intoxication chronique par de petites doses d'indol).

Fig. 1. — (Cobaye 15, 5 mois en expérience). Dans la tunique moyenne, un foyer de dégénérescence hyaline, dont les trois quarts sont calcifiés; dans les parties libres, on voit des restes des cellules. Tout le foyer a la forme d'un ovale allongé fortement comprimé; du côté gauche, on voit une partie d'une forme irrégulière, sans structure déterminée; de petites cellules y sont disséminées sans ordre.

Fig. 2. — (Cobaye 3, 6 mois en expérience). Un grand foyer de dégénérescence hyaline de la paroi de l'aorte; presque toute la moitié gauche est imprégnée de sels calcaires; la partie droite ayant la forme d'un croissant passe à travers toute la partie moyenne de l'aorte et se heurte presque à l'intima; on voit dans cette partie des restes des cellules.

Fig. 3. — (Cobaye 1, 7 mois en expérience). Deux foyers cartilagineux et plusieurs cellules cartilagineuses disséminées, un grand foyer calcaire de la forme d'un triangle irrégulier; on voit dans ce foyer des restes de cellules cartilagineuses.

Pl. XI. — (Cobaye 22, 6 mois en expérience). Coupe transversale de l'aorte à l'endroit où se trouve la valvule moyenne.

Figure. — Un grand foyer de dégénérescence hyaline, contenant des cellules cartilagineuses disséminées; dans le centre, dépôt calcaire de forme d'une sphère.

Fig. a et e. — Deux foyers de dégénérescence hyaline, ne contenant pas de traces d'une structure cartilagineuse.

a) Deux petits foyers semblables.

e) Un foyer de dégénérescence hyaline très grand, presque tout imprégné de sels calcaires.

## TECHNIQUE RATIONNELLE DE LA RÉACTION DE FIXATION

par M. WEINBERG.

On a publié un grand nombre de procédés de réaction de fixation depuis que Wassermann, Bruck et Neisser ont eu l'idée d'utiliser le phénomène de Bordet-Gengou pour l'examen du sérum syphilitique. Cependant, lorsqu'on étudie par ces procédés une même série de sérums, on obtient souvent des résultats discordants. Cela tient d'abord à ce que certains auteurs ont publié leur technique après l'avoir expérimentée sur un nombre trop restreint de sérums; et, surtout, la plupart d'entre eux n'ont guère tenu compte, dans l'interprétation des résultats obtenus, des propriétés hémolytiques du sérum à examiner.

Pendant ces quatre dernières années, nous avons examiné un grand nombre de sérums humains, soit pour y rechercher les anticorps hydatiques, soit pour y trouver quelques éléments pouvant aider au diagnostic clinique du cancer; dans tous ces cas, nous avons fait comparativement la réaction de Wassermann. Voulant nous rendre compte de la cause des résultats contradictoires qu'on obtient par les procédés usuels, nous avons étudié, depuis quelque temps déjà et d'une façon systématique, les propriétés hémolytiques et antihémolytiques de tous les sérums que nous avons utilisés. Cette étude nous permet de donner une technique et une interprétation des résultats obtenus dans l'espoir de mettre les travailleurs à l'abri d'erreurs grossières.

Nous avons ici exclusivement en vue les procédés qui utilisent les globules rouges de mouton. Disons en passant que nous avons obtenu de bons résultats avec le procédé de Noguchi, qui exige un sérum anti-humain et des globules rouges humains. Nous devons cependant modifier quelque peu les indications de doses à employer dans ce procédé, telles que



nous les avons données dans un travail fait en commun avec Bronfenbrenner (1).

TABLEAU I.

TÉMOINS		N <sup>os</sup> des tubes	SÉRUM humain dilué au 1/4.	LIQUIDE hydatique.	ALEXINE à 50 p. 100.	EAU physiolo- gique.	GLOB. ROUGES humains à 10 p. 100. sensibilisés.
	Sérum suspect.	1	0,1	0,1	0,1	0,6	0,1
		2	0,1	0,2	0,1	0,5	0,1
		3	0,1	—	0,1	0,7	0,1
	Sérum hydatique certain.	4	0,1	0,1	0,1	0,6	0,1
		5	0,1	0,2	0,1	0,5	0,1
		6	0,1	—	0,1	0,7	0,1
	Sérum sain.	7	0,1	0,1	0,1	0,6	0,1
		8	0,1	0,2	0,1	0,5	0,1
		9	0,1	—	0,1	0,7	0,1
		10	—	0,2	0,1	0,6	0,1
		11	—	0,4	0,1	0,4	0,1
		12	—	—	0,1	0,8	0,1
		13	—	—	—	0,9	0,1

Nous avons remarqué depuis qu'il n'est pas toujours possible de se contenter de petites doses de sérum; dans deux cas d'échinococcose, nous avons été obligé de doubler et même de tripler la quantité de sérum indiquée dans ce tableau pour arriver à un résultat positif.

#### PROCÉDÉ RAPIDE.

Ceci dit, revenons aux techniques qui nous intéressent ici, c'est-à-dire à celles où l'on emploie les hématies de mouton.

La technique simplifiée (ou les procédés rapides) ont gagné beaucoup de partisans parce que, ne demandant ni alexine de cobaye, ni sérum hémolytique, ils sont à la portée de tout

(1) WEINBERG et BRONFENBRENNER, Application du procédé de Noguchi à l'étude des sérums hydatiques. *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1910, II p. 249-251.

travailleur même peu outillé. Cependant, la pratique de ces procédés d'après les indications fournies par leurs auteurs a donné des mécomptes. Dès nos premières recherches nous avons été à même de constater que les erreurs dues à ce procédé tiennent à la grande variabilité de la teneur du sérum humain en substances hémolytiques. Nous les avons signalées au mois de juin 1910 dans des conférences que M. Martin avait organisées à l'Institut Pasteur pour les internes des hôpitaux (1). L'importance qu'il y a à déterminer la richesse, en substances hémolytiques, du sérum frais, a été, en dehors de nous, reconnue par MM. Hallion et Bauer (2), et par M. Busilla (3).

Pour comprendre les erreurs auxquelles peut donner lieu la pratique de la réaction de fixation par le procédé rapide, on n'a qu'à jeter un coup d'œil sur le tableau II qui résume une partie de nos recherches sur les propriétés hémolytiques du sérum.

Ainsi, sur les 400 sérums étudiés, 9 ont donné l'index hémolytique 0, c'est-à-dire qu'à la dose de 0,1 cent. cube, ils ne dissolvaient pas 0,1 cent. cube de globules rouges de mouton. On obtenait cependant, pour quelques-uns de ces sérums, l'hémolyse en doublant la dose. D'autres étaient franchement anti-alexiques. Dans un quart des cas (exactement, 23 p. 100), l'index n'a pas dépassé 3; dans la moitié des cas, il était de 4 à 7; dans 10 p. 100 des cas, il était de 10-11; enfin, plus

(1) D'ailleurs, déjà en 1909 nous avons constaté qu'il est très important d'étudier le pouvoir hémolytique du sérum frais lorsqu'on veut pratiquer la réaction de fixation par le procédé rapide. C'est ainsi qu'en analysant un travail de M. Parvu, nous avons dit de la méthode simplifiée qu'il préconise pour le séro-diagnostic de l'échinococcose : qu'« elle peut donner de bons résultats à la condition qu'on prenne des précautions, qu'on ne doit jamais oublier, lorsqu'on se sert de procédés rapides : vérification du pouvoir hémolytique des sérums à étudier et contrôle par le procédé lent (avec les globules rouges sensibilisés et l'alexine de cobaye) lorsque le procédé rapide a donné un résultat nettement négatif ». (*Bull. de l'Institut Pasteur*, 1909, p. 774.)

Au moment où parut la note de MM. Hallion et Bauer, nous avions déjà une grande expérience du procédé rapide pratiqué avec la correction sur laquelle ces auteurs ont insisté. C'est ce qui nous a permis d'ailleurs d'indiquer des erreurs que l'on commettrait si l'on suivait certains détails de leur technique (*Bulletin de l'Institut Pasteur*, 1911, p. 108). On trouvera également des indications précises du procédé rapide, tel que nous l'employons depuis deux ans, dans le *Paris Médical* (5 août 1911, p. 232).

(2) HALLION et BAUER, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, t. LXIX, 29 octobre 1910, p. 305.

(3) BUSILLA, *Revista Stintelor Medicale*, n° 10, octobre 1910, p. 838.

rarement, il a dépassé ce chiffre pour atteindre exceptionnellement le chiffre considérable de 21 et même de 23.

Il est évident que le sérum très pauvre en alexine peut donner lieu à la fixation non spécifique et fausser ainsi le résultat de l'expérience. Remarquons à ce propos qu'un index hémolytique élevé, comme celui de 10, par exemple, peut coïncider, rarement il est vrai, avec une quantité faible d'alexine. Dans ces cas, comme nous l'ont prouvé nos recherches, l'index élevé est dû à une grande richesse du sérum en ambocepteurs.

Enfin, un sérum très riche en alexine et ne refermant qu'une petite quantité d'anticorps spécifiques, peut ne perdre, par addition d'antigène, qu'une partie de son alexine. Il en restera donc suffisamment pour déterminer l'hémolyse de globules rouges ajoutés et donner ainsi lieu à une erreur d'interprétation.

TABLEAU II.

## Propriétés hétérolytiques du sérum humain frais.

NOMBRE de sérums.	QUANTITÉS employées.	QUANTITÉ de globules de mouton à 5 p. 100 dissoute.	INDEX hémolytique du sérum frais.
9	0 c. c. 1	0 c. c. 0	0
20	0 c. c. 1	0 c. c. 1	1
42	0 c. c. 1	0 c. c. 2	2
20	0 c. c. 1	0 c. c. 3	3
43	0 c. c. 1	0 c. c. 4	4
69	0 c. c. 1	0 c. c. 5	5
58	0 c. c. 1	0 c. c. 6	6
51	0 c. c. 1	0 c. c. 7	7
17	0 c. c. 1	0 c. c. 8	8
13	0 c. c. 1	0 c. c. 9	9
32	0 c. c. 1	1 c. c. 0	10
9	0 c. c. 1	1 c. c. 1	11
1	0 c. c. 1	1 c. c. 2	12
2	0 c. c. 1	1 c. c. 3	13
3	0 c. c. 1	1 c. c. 4	14
6	0 c. c. 1	1 c. c. 5	15
3	0 c. c. 1	1 c. c. 6	16
1	0 c. c. 1	2 c. c. 1	21
1	0 c. c. 1	2 c. c. 3	23
400			



Lorsque nous pratiquons le procédé rapide, nous faisons d'emblée notre expérience en double, c'est-à-dire que nous répétons deux fois la première série de deux tubes qui renferment le mélange de sérum-antigène-eau physiologique; nous déterminons en même temps l'index hémolytique du sérum à examiner dans une série de tubes placés en arrière de la première série, comme l'indique le tableau III. Dans ces tubes, à 0,1 cent. cube de sérum, on ajoute des doses régulièrement croissantes de globules de mouton. Cela est suffisant, car dans plus de 90 p. 100 des cas l'index hémolytique ne dépasse guère 10 (1).

TABLEAU III.  
Procédé rapide.

RÉACTION DE FIXATION					RECHERCHE DE L'INDEX HÉMOLYTIQUE				
N <sup>os</sup> des tubes.	Sérum frais.	Liquide hydatique ou antigène syphilitique.	Eau physiologique.		N <sup>os</sup> des tubes.	Sérum frais.	Globules rouges de mouton à 5 p. 100	Eau physiologique.	
1	0,1	0,1	0,2	Une heure d'étuve à 37 degrés.	1	0,1	0,1	1 c. c.	Une heure d'étuve à 37 degrés.
2	0,1	0,2	0,1		2	0,1	0,2	0,9	
3	0,1	—	0,3		3	0,1	0,3	0,8	
»	»	»	»		4	0,1	0,4	0,7	
»	»	»	»		5	0,1	0,5	0,6	
»	»	»	»	Une demi-heure d'étuve à 37 degrés.	6	0,1	0,6	0,5	
4	0,1	0,1	0,2		7	0,1	0,7	0,4	
5	0,1	0,2	0,1		8	0,1	0,8	0,3	
6	0,1	—	0,3		9	0,1	0,9	0,2	
»	»	»	»		10	0,1	1 c. c.	0,1	

Lorsqu'on a quelques raisons de croire (tuberculose, cancer, suppuration, etc...) qu'on est en présence d'un sérum forte-

(1) La question de l'antigène ne nous préoccupe pas ici. Il est bien entendu que dans le cas de syphilis nous employons, comme maximum, le tiers de la dose la plus forte d'antigène, incapable par elle-même d'empêcher l'hémolyse. Nous avons toujours obtenu les meilleurs résultats dans les cas d'échinococcose avec le liquide hydatique de foie de mouton.

ment hémolytique, on peut employer des doses doubles d'hématies, en allant de 0,2 à 2 cent. cubes. D'ailleurs, si, en procédant d'après les indications ordinaires, on obtient une hémolyse complète dans le dernier tube, ce qui indiquerait que l'index 10 peut être dépassé, la durée de l'expérience n'en est nullement prolongée. En effet, si élevé que soit cet index, on doit continuer l'expérience de la même façon : ajouter dans chaque tube de la première série (tubes 1, 2, 3) 0,1 cent. cube de globules rouges et 0,2 cent. cube dans chaque tube de la deuxième (tubes 4, 5, 6). On a tout le temps, pendant la 1/2 heure de séjour de ces tubes à l'étuve à 37 degrés, de compléter la détermination de l'index hémolytique en préparant de nouveaux mélanges de 0,1 cent. cube avec des doses plus considérables de globules rouges.

Nous avons dit que nous ajoutions toujours, dans chaque série de tubes composant une expérience de fixation, la dose constante de globules rouges (0,1 cent. cube pour la première et 0,2 cent. cube pour la deuxième série); et en cela aussi notre pratique diffère de celle conseillée par Hallion et Bauer, d'une part, et par Busilla, d'autre part. Ces savants déterminent la dilution maxima de globules rouges dissous par 0,1 cent. cube de sérum frais et emploient pour leur réaction une émulsion beaucoup plus faible.

Cette pratique est défectueuse car la dose employée par ces auteurs est, dans beaucoup de cas, supérieure à celle qui donne le meilleur résultat. D'autre part, il est très dangereux d'employer une dilution de globules rouges inférieure à 1/20, ce que ces auteurs sont nécessairement amenés à faire lorsque l'index hémolytique est de 1.

*Interprétation.* — Il arrive exceptionnellement que le sérum frais soit anti-alexique; dans ces conditions, la pratique du procédé rapide est impossible. Si l'index hémolytique est 0, on peut, le plus souvent, comme cela a été déjà indiqué par d'autres auteurs, obtenir l'hémolyse en doublant la dose de sérum.

Nous avons vu plus haut que dans nos observations, l'index hémolytique était 91 fois sur 400 de 0 à 3; cela veut dire que, dans 22,75 p. 100 de cas, le résultat obtenu ne pouvait être considéré comme définitif que lorsqu'il était nettement négatif.

On peut parfois obtenir une réaction négative, même en employant 0,2 cent. cube de globules rouges avec du sérum dont l'index est de 2 ou 3, surtout en utilisant un antigène très pauvre en substances anticomplémentaires.

Lorsque l'index hémolytique dépasse la moyenne (8-10), il ne faut tenir compte du résultat que s'il est obtenu avec 0,1 cent. cube de globules rouges. Encore faut-il se rappeler qu'on trouve des sérums, nous en avons parlé déjà plus haut, qui peuvent donner un index hémolytique élevé tout en étant pauvres en alexine. Ces cas sont heureusement très rares.

Lorsque l'index dépasse 10, le résultat positif obtenu avec 0,1 cent. cube d'hématies doit être, en général, considéré comme certain et définitif.

En somme, pour nous, la pratique de l'expérience en double et la détermination de l'index hémolytique servent uniquement à juger avec certitude le résultat obtenu avec 0,1 cent. cube de globules rouges.

Ceux fournis par 0,2 de globules rouges ne seront utiles qu'autant qu'ils confirmeront le résultat négatif obtenu avec la première dose d'hématies.

*On ne doit se contenter du procédé rapide que lorsqu'on obtient un résultat nettement négatif avec les sérums dont l'index ne dépasse pas 3, et un résultat nettement positif lorsqu'on a une fixation très nette avec un sérum dont l'index dépasse 10, la dose de globules rouges restant de 0,1.*

Si les résultats donnés par les deux expériences du procédé rapide sont contradictoires, on doit les considérer comme douteux, et recourir au procédé lent.

#### PROCÉDÉ LENT.

Pour que la réaction soit pratiquée dans de bonnes conditions par le procédé lent, il est indispensable que tous les tubes de l'expérience renferment la même quantité d'ambocepteurs hémolytiques et d'alexine. Or, ces conditions sont rarement réalisées; cela provient de la teneur variable du sérum humain en ambocepteurs anti-mouton, dont l'action s'ajoute à celle du sérum hémolytique artificiel et trouble ainsi la régularité de l'expérience.



La lecture du tableau IV permet de se rendre compte des différences quantitatives considérables que présentent les sérums, chauffés, quant à leur propriété de sensibiliser les globules de mouton. On y voit que, dans 121 cas sur 254 (dans 47 p. 100 des cas environ), l'index ne dépasse pas 3; que, dans un quart de cas (62 sur 254), il atteint ou dépasse 10; enfin, il peut atteindre les chiffres 20 et 25, c'est-à-dire que exceptionnellement 0,4 cent. cube de sérum serait capable de sensibiliser 2 cent. cubes et même 2,5 cent. cubes de globules rouges de mouton.

TABLEAU IV.  
Propriétés hétérolytiques du sérum humain  
chauffé une demi heure à 56 degrés.

NOMBRE de sérums examinés.	QUANTITÉ de sérum employée.	ALEXINE de cobaye à 50 p. 100.	QUANTITÉ de globules de mouton à 5 p. 100 dissoute.	INDICE apparent d'ambocepteurs hétérolytiques.
13	0 c. c. 1	0 c. c. 1	0 c. c. 0	0
37	0 c. c. 1	0 c. c. 1	0 c. c. 1	1
31	0 c. c. 1	0 c. c. 1	0 c. c. 2	2
40	0 c. c. 1	0 c. c. 1	0 c. c. 3	3
20	0 c. c. 1	0 c. c. 1	0 c. c. 4	4
12	0 c. c. 1	0 c. c. 1	0 c. c. 5	5
20	0 c. c. 1	0 c. c. 1	0 c. c. 6	6
11	0 c. c. 1	0 c. c. 1	0 c. c. 7	7
3	0 c. c. 1	0 c. c. 1	0 c. c. 8	8
5	0 c. c. 1	0 c. c. 1	0 c. c. 9	9
25	0 c. c. 1	0 c. c. 1	1 c. c. 0	10
3	0 c. c. 1	0 c. c. 1	1 c. c. 1	11
6	0 c. c. 1	0 c. c. 1	1 c. c. 2	12
7	0 c. c. 1	0 c. c. 1	1 c. c. 3	13
4	0 c. c. 1	0 c. c. 1	1 c. c. 4	14
7	0 c. c. 1	0 c. c. 1	1 c. c. 5	15
3	0 c. c. 1	0 c. c. 1	1 c. c. 6	16
1	0 c. c. 1	0 c. c. 1	1 c. c. 7	17
3	0 c. c. 1	0 c. c. 1	2 c. c. 0	20
1	0 c. c. 1	0 c. c. 1	2 c. c. 3	23
1	0 c. c. 1	0 c. c. 1	2 c. c. 4	24
1	0 c. c. 1	0 c. c. 1	2 c. c. 5	25
254				

La richesse parfois considérable du sérum humain chauffé en

ambocepteurs hémolytiques avait inspiré à Bauer un procédé dans lequel on se passe de sérum hémolytique artificiel. Cette manière de faire, appliquée uniformément à tous les sérums, est aussi défectueuse que la pratique dans laquelle on ne tient pas du tout compte de l'index de la sensibilisatrice.

Notre expérience nous a, en effet, montré que la réaction de fixation faite avec des globules rouges non sensibilisés, ne peut donner de résultats convenables que lorsque l'index des sensibilisatrices du sérum chauffé atteint ou dépasse 10.

Or, cet index élevé n'est obtenu, comme nous l'avons vu plus haut, qu'avec 25 p. 100 des sérums.

De plus, il faut noter qu'on trouve quelquefois des sérums à index 10, lesquels, examinés par le procédé de Bauer, donnent une légère fixation non spécifique. L'explication de ce fait doit être cherchée dans l'action des substances anti-alexiques contenues en quantités plus ou moins considérables dans le sérum chauffé, et dont l'existence nous a déjà permis de constater la grande différence qui existe parfois entre l'*index apparent* et l'*index vrai* d'ambocepteurs d'un même sérum chauffé (1).

Dans le procédé lent, on emploie les doses de 0,3 cent. cube de sérum chauffé; or, l'action des doses croissantes du sérum chauffé est très inégale. Ainsi les 0,3 cent. cube d'un sérum à index 10 peuvent, en présence d'une même alexine, provoquer l'hémolyse d'une quantité de globules notablement inférieure à 3 cent. cubes, comme le montre le tableau ci-dessous.

Il faudra donc tenir compte de cet affaiblissement du pouvoir hémolytique des doses croissantes lorsqu'on voudra déterminer la quantité de sérum hémolytique à ajouter dans chaque tube de l'expérience renfermant du sérum chauffé.

Le tableau VI indique les doses que nous employons dans le procédé lent, que la réaction soit faite avec le sérum syphilitique ou échinococcique.

Comme on le voit, nous répétons la première partie de l'expérience en double.

Nous admettons que, pour la bonne conduite de la réaction de fixation, il faut employer 30 unités hémolytiques; c'est-à-dire qu'il faut sensibiliser chaque centimètre cube de globules

(1) Voir notre communication à la Société de Biologie, séance du 18 novembre 1911, t. LXXI, p. 453.

rouges avec 0,1 cent. cube d'une dilution de sérum lapin-mouton capable par lui-même de sensibiliser 3 cent. cubes d'hématies.

TABLEAU V.

NOMBRE de sérums ayant le même pouvoir sensibilisant.	INDEX d'ambocepteurs anti-mouton.	QUANTITÉ DE GLOB. ROUGES (à 5 p. 100) dissous par la même quantité d'alexine après sensibilisation par 0,3 c. c. de sérum.
11	1	0,3 c. c. pour 10 sérums. 0,2 c. c. — 1 —
9	2	0,8 c. c. pour 1 sérum. 0,6 c. c. — 3 — 0,5 c. c. — 5 —
10	3	0,8 c. c. pour 4 sérums. 0,7 c. c. — 4 — 0,5 c. c. — 2 —
2	4	1,1 c. c. pour 1 sérum. 0,8 c. c. — 1 —
3	5	1,3 c. c. pour 1 sérum. 1,2 c. c. — 2 sérums.
4	6	1,5 c. c. pour 3 sérums. 1,4 c. c. — 1 sérum.
2	7	1,8 c. c. pour 2 sérums.
1	9	2,5 c. c. pour 1 sérum.
2	10	2,5 c. c. pour 1 sérum. 2,0 c. c. — 1 —
1	11	2,5 c. c. pour 1 sérum.
3	12	3,0 c. c. pour 1 sérum. 2,5 c. c. — 2 sérums.
1	13	3,0 c. c. pour 1 sérum.
2	14	4,0 c. c. pour 1 sérum. 3,5 c. c. — 1 —
2	15	3,0 c. c. pour 1 sérum. 3,5 c. c. — 1 —
53		53 sérums.

La première série de tubes recevra comme sérum hémoly-



tique non pas 30 unités, mais 30 unités moins le nombre qui sera indiqué par l'index d'ambocepteurs déterminé pour chaque sérum à examiner, d'après les indications données dans la partie droite du tableau VI.

Prenons un exemple concret. Supposons que nous ayons obtenu le chiffre 6 comme titre de la sensibilisatrice hémolytique anti-mouton du sérum chauffé A. Cela veut dire qu'un dixième de ce sérum est capable de sensibiliser 0,6 cent. cube de globules rouges. Ce sérum renferme donc, à la dose de 0,4 cent. cube, 6 unités d'ambocepteurs. Comme nous employons dans notre expérience de fixation 0,3 cent. cube de chaque sérum à examiner, il s'ensuit que les 4 premiers tubes renfermeront déjà, de par la présence du sérum, 18 unités hémolytiques, tandis qu'il n'y en aura pas du tout dans les tubes témoins. Comme d'autre part chaque tube de l'expérience doit recevoir 30 unités, il faudra donc n'ajouter dans les 4 premiers tubes que 12 unités seulement. En réalité, pour corriger l'action anti-alexique des doses croissantes de sérum chauffé, il faut faire le calcul en se basant sur le chiffre d'une unité inférieure à celui indiqué par l'index.

Ainsi dans notre exemple l'index étant de 6, nous ferons notre calcul d'après l'index 5. Nous agirons donc comme si les 0,3 cent. cube de sérum renfermaient 15 et non 18 unités d'ambocepteur.

Il est évident qu'on ne versera pas du tout de sérum hémolytique dans les 4 premiers tubes de l'expérience lorsque le titre de la sensibilisation atteint ou dépasse 10.

Pour bien pratiquer la réaction de fixation, il faut titrer avec soin le sérum hémolytique lapin-mouton et établir exactement la dilution dont 0,4 cent. cube sensibilise 1 cent. cube de globules rouges, c'est-à-dire correspondant à 10 unités hémolytiques. On prépare rapidement une dilution extemporanée, supplémentaire, suivant la quantité d'ambocepteurs à ajouter dans les premiers tubes.

Dans la pratique courante, comme un léger excès de sensibilisatrice n'influe pas défavorablement sur le résultat de la réaction, nous procédons de la façon suivante : Nous ne tenons pas compte de l'index tant qu'il ne dépasse pas 3; dans ce cas, il est inutile de faire l'expérience en double, tous les tubes reçoivent

TABLEAU VI.

## Procédé lent.

RÉACTION DE FIXATION (KISTE HYDATIQUE)					RÉACTION DE FIXATION (SYPHILIS)					TITRAGE DE LA SENSIBILISATION DU SÉRUM CHAUFFÉ				
Sérum chauffé à 56 degrés 1/2 heure.	Liquide hydatique.	Alexine diluée de moitié.	Eau physiologique.	Une heure d'éluve à 37 degrés.	Globules rouges insensibilisés.	Nos des tubes.	Sérum chauffé à 56 degrés 1/2 heure.	Antigène syphilitique.	Alexine diluée de moitié.	Eau physiologique.	Une heure d'éluve à 37 degrés.	Globules rouges (sensibilisés).	Nos des tubes.	Sérum chauffé à 56 degrés 1/2 heure.
1	0	0,1	1,4	Une heure d'éluve à 37 degrés.	1 c. c.	1	0,3	0,1	0,1	1,5	1 c. c.	1 c. c.	1	0,1
2	0,3	0,1	1,3		1 c. c.	2	0,3	0,1	0,1	1,4	1 c. c.	1 c. c.	2	0,1
3	0,3	0,1	1,2		1 c. c.	3	0,3	0,3	0,1	1,3	1 c. c.	1 c. c.	3	0,1
4	0,3	0,1	1,6		1 c. c.	4	0,3	—	0,1	1,6	1 c. c.	1 c. c.	4	0,1
5	0,3	0,1	1,4		1 c. c.	5	0,3	0,1	0,1	1,5	1 c. c.	1 c. c.	5	0,1
6	0,3	0,1	1,3		1 c. c.	6	0,3	0,2	0,1	1,4	1 c. c.	1 c. c.	6	0,1
7	0,3	0,1	1,2		1 c. c.	7	0,3	0,3	0,1	1,3	1 c. c.	1 c. c.	7	0,1
8	0,3	0,1	1,6		1 c. c.	8	0,3	—	0,1	1,6	1 c. c.	1 c. c.	8	0,1
9	—	0,4	1,5		1 c. c.	9	—	0,2	0,1	1,7	1 c. c.	1 c. c.	9	0,1
10	—	0,6	1,3		1 c. c.	10	—	0,4	0,1	1,5	1 c. c.	1 c. c.	10	0,1
11	—	0,8	1,1		1 c. c.	11	—	0,6	0,1	1,3	1 c. c.	1 c. c.	11	0,1
12	—	—	1,9		1 c. c.	12	—	—	0,1	1,9	1 c. c.	1 c. c.	12	0,1
13	—	—	2 <sup>cc</sup>		1 c. c.	13	—	—	—	2 <sup>cc</sup>	1 c. c.	1 c. c.	13	0,1

vent la même quantité d'ambocepteurs hémolytiques. Lorsque l'index est de 4 à 6, sensibiliser chaque centimètre cube de globules rouges destinés aux 4 premiers tubes de l'expérience avec 20 unités hémolytiques. Si l'index est de 7, 8, 9, employer 15 unités.

On simplifie l'opération en préparant 3 dilutions de sérum hémolytique dont 0,1 cent. cube représente 30, 15 ou 10 unités d'ambocepteurs.

Les globules rouges sont utilisés sans sensibilisation préalable, si l'index atteint ou dépasse 10.

Cette manière de faire ne prolonge la durée de l'expérience que de quelques minutes; ce petit inconvénient s'efface devant l'avantage d'assurer une précision beaucoup plus grande.

Avant d'aborder l'interprétation des résultats obtenus, il nous paraît nécessaire d'insister sur un autre détail de technique. On emploie dans cette expérience le sérum de cobaye. Or, la teneur du sérum de cobaye en alexine est très variable, comme cela était déjà observé par Massol et Grysez ainsi que par Noguchi. Le sérum de cobaye renferme non seulement de l'alexine, mais aussi des ambocepteurs anti-mouton; ces derniers peuvent, exceptionnellement, s'y trouver en quantité assez considérable.

TABLEAU VII.  
Propriétés hétérolytiques du sérum de cobaye frais.

NOMBRE de sérums examinés.	QUANTITÉ de sérum à 50 p. 100 employée.	QUANTITÉ de globules de moutons à 5 p. 100 dissoute.
49	0 c. c. 3	0 c. c. 0
23	0 c. c. 3	0 c. c. 1
49	0 c. c. 2	0 c. c. 1
33	0 c. c. 1	0 c. c. 1
5	0 c. c. 1	0 c. c. 2
8	0 c. c. 1	0 c. c. 3
1	0 c. c. 1	1 c. c. 2
140		

L'étude de 140 sérums de cobayes résumée dans ce petit



tableau montre que si dans la moitié des cas il faut 0,2 à 0,3 cent. cube de sérum pour dissoudre 0,1 d'hématie de mouton, dans 10 p. 100 des cas 0,1 cent. cube d'alexine dissout 0,2 et 0,3 cent. cube des mêmes globules. Dans un cas, nous avons même obtenu l'hémolyse de 1,2 cent. cube de globules avec la même dose (0,1) d'alexine. Il y a aussi un autre facteur sur lequel l'attention a été attirée par Noguchi et Bronfenbrenner.

Ces auteurs ont remarqué que la propriété de l'alexine d'être fixée par la combinaison antigène-anticorps est très variable suivant les cobayes. Leur étude a cependant montré que, dans la moitié des cas, le sérum de cobaye possède une fixabilité moyenne.

Il est donc bon pour obvier à tous les inconvénients présentés par la teneur variable du sérum de cobaye en alexine, ambocepteurs anti-mouton et également par la propriété variable de se laisser fixer par l'antigène-anticorps, d'employer un mélange de sérum de 3 cobayes. En tout cas, il est nécessaire de vérifier les propriétés du sérum de cobaye, lorsque pour des raisons quelconques on ne disposera que du sérum d'un seul animal.

Nous avons également employé un autre procédé lent dans lequel le sérum humain est débarrassé après le chauffage à 56 degrés de tous les ambocepteurs hémolytiques par contact d'une demi-heure à l'étuve à 37 degrés avec un excès de globules rouges de mouton. Ce procédé avait déjà été employé par Apphatil et Lorentz, par nous-même ainsi que par Müntz et par Rossi. Dans la grande majorité des cas cette technique donne de bons résultats. Cependant, nous ne conseillons pas de l'employer, car, dans 2 cas, sur 50 sérums, nous avons obtenu des résultats peu satisfaisants.

#### INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS OBTENUS PAR LE PROCÉDÉ LENT.

Appelons série A la première rangée de tubes où le sérum hémolytique lapin-mouton n'a été ajouté qu'en quantité suffisante pour compléter les ambocepteurs naturels, et série B la deuxième série de 4 tubes pour lesquels les globules rouges ont été sensibilisés de la même façon que pour les tubes témoins.

Remarquons d'abord que la série B ne peut pas donner de résultat positif si la réaction est négative dans les tubes de la série A.

Le résultat négatif de A donne une certitude au résultat négatif de la série B; d'autre part, le résultat positif donné par la série A est corroboré par la réaction positive donnée par la série B, dans laquelle les globules sont sensibilisés, le plus souvent, avec un excès d'ambocepteurs.

Lorsque une réaction légèrement positive de la série A n'est pas confirmée par la série B, il faut considérer le cas comme douteux.

#### DISCUSSION DES RÉSULTATS OBTENUS PAR LES DEUX PROCÉDÉS POUR LE MÊME SÉRUM.

Il y a des sérums pour lesquels la réaction ne peut être pratiquée d'une façon convenable; il arrive, en effet, exceptionnellement, que le sérum renferme soit à l'état frais, soit après chauffage à 56 degrés, une quantité considérable de substances anti-complémentaires. L'index anti-alexique d'un des sérums que nous avons étudié était de 8; c'est-à-dire que 0,8 cent. cube d'alexine à 50 p. 100 étaient nécessaires pour neutraliser l'action anti-hémolytique de 0,1 cent. cube de ce sérum.

Nous présentons ici un petit tableau qui résume les résultats qu'on peut obtenir en examinant un même sérum simultanément par les procédés rapide et lent.

On voit d'après ce résumé, qu'en somme on ne pourrait se dispenser du procédé lent que lorsque le procédé rapide donne une réaction nettement négative avec un index très faible ou bien en présence d'un résultat franchement positif donné par un sérum dont l'index atteint ou surtout dépasse 10. Or, d'après notre statistique de l'index hémolytique du sérum frais (tableau II), le nombre de ces cas est limité, surtout si l'on considère que beaucoup de ces sérums donnent justement des résultats contraires à ceux que nous venons d'indiquer.

Il faudra donc, pour la plupart des cas, répéter l'expérience par le procédé lent. Personnellement, nous recommandons vivement de faire des recherches parallèles par les deux réactions pour se mettre à l'abri de toute erreur. Il y a, en effet, des

sérums frais à index élevé, mais pauvres en alexine; dans ce cas, la réaction positive à cause du manque d'alexine, sera corrigée par le procédé lent.

	RÉACTION OBTENUE par le procédé rapide.	RÉACTION OBTENUE par le procédé lent.	RÉSULTAT doit-être considéré comme :
I I a	+	+	+
	Index hémol. faible.	0	0
II II a	+	+	+
	Index moyen ou élevé.	0	Douteux.
III III a	0	0	0
	Index faible.	+	Douteux.
IV IV a	0	0	0
	Index moyen.	+	+
V V a	0	0	0
	Index élevé.	+	Douteux.

Maintenant nous allons examiner l'un après l'autre les cas qui peuvent se présenter, en laissant de côté, bien entendu, les résultats concordants par les deux procédés.

Le cas I a doit être considéré comme négatif; il est évident que la réaction positive obtenue par le procédé rapide indique une fixation non spécifique due au manque d'alexine.

Le cas II a doit être considéré comme douteux. Il peut arriver, en effet, que le chauffage à 56 degrés ait détruit une trop grande quantité d'anticorps spécifiques pour permettre le phénomène de fixation du complément. La diminution d'ambocepteurs naturels ou d'immunisation est un fait connu. D'après notre statistique, la perte en ambocepteurs par le chauffage à 56 degrés peut atteindre jusqu'à 80 p. 100. On comprend alors que le chauffage puisse dans certains cas influencer défavorablement la réaction de fixation, surtout lorsque les anticorps ne sont pas en grande quantité.



Nous avons déjà expliqué la raison du cas II *a*; on trouve des sérums frais dont l'index hémolytique élevé (8-10) est surtout dû à l'excès d'ambocepteurs anti-mouton; le procédé lent corrige facilement l'erreur du procédé rapide. Ces cas sont rares.

Nous n'avons jamais rencontré de sérum rentrant dans la catégorie III *a*; la raison en est facile à comprendre.

Les cas rentrant dans la catégorie IV *a*, doivent aussi être expliqués par la pauvreté relative du sérum frais en alexine.

On comprend aisément que dans le cas V *a*, la fixation du complément par le procédé rapide soit masquée par l'excès d'alexine. Lorsqu'une réaction légère obtenue par le procédé rapide n'est pas corrigée par un résultat très net du procédé lent, on se trouve en présence d'un cas douteux.

Ces réactions légères ou douteuses peuvent être dues soit à la présence d'une quantité insuffisante d'anticorps, soit à des substances non spécifiques se trouvant momentanément dans le courant circulatoire et qui sont dues probablement (ou bien) au régime alimentaire ou bien à l'élaboration de produits pathologiques au niveau des organes atteints.

Quelle que soit la minutie apportée dans la pratique de la séro-réaction, il est impossible d'éviter complètement les réactions légères, douteuses. On peut cependant arriver à leur juste interprétation en étudiant de près les propriétés anti-hémolytiques du sérum à examiner.

Les résultats douteux ne peuvent nullement servir au diagnostic clinique de la syphilis ou de l'échinococcose. Mais ils permettent de suivre la réaction de l'organisme chez les malades avec le sérum desquels on a obtenu avant le traitement de la syphilis ou bien avant l'opération de kyste hydatique une fixation du complément très nette, négative ou positive.

Nous sommes convaincus que le pourcentage des réactions positives obtenues chez les malades syphilitiques est bien supérieur à la réalité, justement à cause des réactions légères, non spécifiques, mais considérées comme positives pour la seule raison qu'elles concernaient des malades reconnus ensuite syphilitiques par l'éclosion de symptômes décisifs; et cela d'autant plus que le nombre de ces réactions douteuses augmente considérablement lorsqu'on pratique la réaction de fixation sans tenir compte des propriétés hémolytiques du sérum.

# **PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES**

## **DE SUBSTANCES ALBUMINOÏDES EXTRAITES**

### **DU CERVEAU**

par A. MARIE.

Dans l'étude expérimentale des toxi-infections locales, comme la diphtérie, le tétanos, la rage, la fixation de l'antigène sur certaines substances chimiques de l'organisme s'offre à nous comme une recherche des plus intéressantes, puisqu'elle nous fait pénétrer dans l'intimité des phénomènes et qu'elle touche à la question des réactions d'immunité.

Mais, tandis qu'on n'a jamais réussi à préparer le composé de nature albuminoïdique (1) auquel la matière nerveuse doit ses propriétés antitétaniques, nous avons pu isoler du cerveau une substance offrant les réactions générales des albuminoïdes et qui présente le pouvoir de neutraliser le virus de la rage. Dans ce travail, après avoir exposé les propriétés antirabiques des extraits de la matière cérébrale, nous montrerons qu'ils sont doués également d'une certaine toxicité pour l'organisme.

#### **I. — PROPRIÉTÉS ANTIRABIKES.**

Certains faits déjà anciens, en particulier l'action protectrice des filtrats de substance cérébrale contre une infection rabique, nous avaient conduit à supposer dans le cerveau l'existence d'un pouvoir neutralisant. Si l'on injecte dans le sang, à des lapins, une quantité convenable du filtrat de cet organe, on peut les voir résister à une infection rabique pratiquée par la voie oculaire (2). Remlinger avait même observé que le virus filtré, injecté à dose massive sous la peau, pouvait conférer aux animaux une immunité leur permettant de résister à l'inoculation virulente sous-méningée (3). Toutefois, en dépit de nombreux essais pratiqués *in vitro*, nous n'avions jamais réussi à démontrer,

dans les filtrats cérébraux, l'existence d'un principe neutralisant du virus.

Ayant eu alors à notre disposition l'encéphale d'une personne morte de rage, nous avons soumis à l'action du vide sulfurique le liquide obtenu en comprimant le cerveau broyé avec du sable à plusieurs centaines d'atmosphères. En reprenant par l'eau distillée le suc desséché et pesé, on peut préparer une solution isotonique et la stériliser au moyen d'un filtre Chamberland. Elle présente une propriété remarquable : additionnée de son volume d'une émulsion centésimale de virus fixe, elle la neutralise en quelques heures, car le mélange injecté dans le cerveau d'un animal se montre absolument inoffensif pour lui.

Ce pouvoir neutralisant ne se manifeste pas seulement avec l'extrait de cerveau rabique; on peut l'observer en utilisant l'encéphale d'individus ayant succombé aux maladies les plus diverses, en particulier à des affections nerveuses telles que la paralysie générale, auquel cas les propriétés antirabiques se montrent plus énergiques.

Le principe auquel les extraits cérébraux sont redevables de leur action neutralisante se trouve entraîné par des précipités offrant les caractères généraux des nucléoprotéides, comme le prouve le mode de préparation suivant.

On traite par une solution sodique faible (1 p. 100) un fragment de cerveau humain et on filtre l'émulsion sur bougie. Après addition d' $\text{HCl}$ , le précipité obtenu est recueilli par centrifugation puis redissous dans un liquide convenable, du sérum sanguin par exemple. Il présente *in vitro* des propriétés antirabiques analogues à celles que nous avons reconnues au suc de presse, préparé comme nous l'avons dit (4).

Nous avons résumé en un tableau quelques-unes de ces expériences. (Tableau I.)

Il résulte de celles-ci que le cerveau, le seul organe qui assure la culture du virus rabique, renferme une substance douée d'une affinité élective, d'un pouvoir neutralisant pour lui, que cette substance, partiellement soluble à la faveur des produits complexes entrant dans la composition de cet organe, est entraînée par des précipités nucléoprotéïques et se présente comme étant thermostable. Nous allons montrer maintenant que cette substance est de nature albuminoïdique.



TABLEAU I

ACTION NEUTRALISANTE EXERCÉE PAR LE SUC DE PRESSE ET LA NUCLÉOPROTÉINE.

ANIMAUX	INOCULATION INTRACÉRÉBRALE	RÉSULTATS
1. Cobaye.	Suc du cerveau rabique humain + VF 1 p. 100 à PE. . . . .	∞
2. Lapin.	1 partie du même suc + 2 parties de VF 1 p. 100.	∞
3. Cobaye.	Suc du cerveau (enfant diphtérique) + VF 1 p. 100 à PE. . . . .	∞
4. Cobaye.	Suc cérébral (PGP) + VF 1 p. 100. Centrifugation et injection du dépôt. . . . .	∞
5. Cobaye.	1 partie du même suc cérébral + 4 parties de VF 1 p. 100 . . . . .	∞
6. Cobaye.	Suc chauffé 40 minutes à 55 degrés + VF 1 p. 100 à PE. . . . .	∞
7. Cobaye.	Nucléoprotéine cérébrale neutralisée + VF 1 p. 100 à PE . . . . .	∞
8. Lapin.	La même chauffée à 56 degrés + VF 1 p. 100 à PE.	∞

Dans son travail classique sur les protéines du tissu nerveux (5), Halliburton admet que la matière albuminoïde s'y présente sous trois états, une neuroglobuline  $\alpha$ , coagulable à 47 degrés, une neuroglobuline  $\beta$ , coagulable à 70 — 75 degrés, l'une et l'autre précipitables par les sels neutres et ne contenant pas de Ph, enfin un nucléoprotéide coagulable à 56 — 60 degrés, renfermant 0,50 p. 100 de Ph, et pour lequel il préconise le mode de préparation suivant. L'encéphale, débarrassé du sang et des méninges, est broyé et traité par une grande quantité d'H<sub>2</sub>O pendant vingt-quatre heures, après quoi le liquide surnageant est décanté et précipité par l'acide acétique à 33 p. 100, à raison de 0,50 cent. cubes pour chaque centimètre cube de liquide ; le précipité est lavé à l'eau distillée. Il ne diffère guère de ceux que nous avons obtenus en traitant la matière nerveuse par des solutions alcalines faibles, car nous avons constaté que ce précipité entraîne également la substance antirabique puisque, additionné, après dialyse, de VF à 1 p. 100, il le neutralise semblablement.

Par contre, nous avons obtenu des résultats inconstants en utilisant le mode de préparation indiqué par Levene (6), consistant à épuiser la matière cérébrale par une solution de NH<sub>4</sub>Cl à 4 p. 100 et à précipiter le filtrat par l'acide acétique.

Qu'il s'agisse de la technique de Halliburton ou de celle de Levene, le mode de préparation est assez laborieux, sa lenteur expose les albuminoïdes du cerveau à des altérations diverses ; il faut donc obtenir à l'état pur le produit jouissant par lui-même des propriétés antirabiques. A la suite de nombreux essais, nous nous sommes arrêté à la technique suivante (7) :

On prépare dans 100 cent. cubes d'eau distillée une émulsion de 10 grammes de cerveau finement broyé, à laquelle on ajoute X gouttes d'acide acétique cristallisable. Après agitation convenable, on centrifuge ou bien on jette sur un filtre le précipité qui est repris par environ 40 cent. cubes d'eau et traité de nouveau par l'acide acétique (1 cent. cube) ; on filtre le mélange pour obtenir le liquide clair qui contient le principe neutralisant ainsi que le nucléoprotéide du cerveau. On peut alors précipiter celui-ci par NaCl à 20 p. 100.

La solution active isolée de la sorte sera neutralisée et dialysée avec soin avant d'être mise en contact avec le virus rabique (pendant vingt-quatre heures).

Ses caractères chimiques sont ceux d'un acidalbuminoïde. Il ne contient pas de Ph, est précipité de ses solutions par la dialyse, par neutralisation ; la température de l'ébullition n'y détermine pas de coagulum, le sulfate de magnésie à saturation le précipite. En plus de ces réactions de précipitation, cette substance présente celles de coloration communes à tous les albuminoïdes (réactions de Millon, du biuret, xanthoprotéique).

Si l'on prépare un mélange de cet acidalbuminoïde et de virus fixe, on trouve que celui-ci ne tarde pas à perdre ses propriétés pathogènes.

La même émulsion virulente traitée par du sérum neuf additionné de quantités variables d'acétate de soude, ou encore par des solutions plus ou moins concentrées de ce sel, conserve tout son pouvoir pathogène. Un autre organe que l'encéphale, la rate par exemple, traitée de la même façon que lui, ne montre aucune propriété neutralisante. (Tableau II.)

Les propriétés neutralisantes que l'expérimentation révèle dans cet acidalbuminoïde font défaut dans les autres substances protéiques du cerveau. Ainsi le premier filtrat obtenu dans notre mode de préparation et qui renferme les neuroglobulines, le résidu laissé par la filtration de la liqueur contenant le nucléo-

protéide (1), celui-ci lui-même, n'exercent aucune action neutralisante sur le virus rabique.

TABLEAU II

ACTION NEUTRALISANTE DE L'ACIDALBUMINOÏDE EXTRAIT DU CERVEAU NEUF.

ANIMAUX	INOCULATION INTRACÉRÉBRALE	RÉSULTATS
1. Cobaye.	Acidalbuminoïde de mouton + VF 1 p. 100 à PE.	∞
2. Cobaye.	Acidalbuminoïde de cerveau humain (PGP) + VF 1 p. 100 . . . . .	∞
3. Cobaye.	1 partie de cet albuminoïde + 5 parties de VF 1 p. 100 . . . . .	∞
4. Cobaye.	Le même, chauffé 30 minutes à 56 degrés + VF 1 p. 100 à PE . . . . .	∞
5. Cobaye.	Acidalbuminoïde de mouton chauffé à 80 degrés + VF 1 p. 100 . . . . .	∞
6. Cobaye.	Le même, chauffé à 100 degrés + VF 1 p. 100 . . .	∞
7. Cobaye.	Acétate de soude à 10 p. 100 + VF 1 p. 100 . . . .	Rage.
8. Cobaye.	Sérum neuf traité comme le cerveau + VF 1 p. 100.	Rage.
9. Lapin.	Rate traitée comme le cerveau + VF 1 p. 100 . . .	Rage.

Cette propriété anti d'une substance protéique extraite du cerveau nous paraît susceptible d'expliquer plus d'un fait demeuré obscur dans l'étude de la rage. Ainsi nous avons vu qu'en soumettant la matière cérébrale à une pression de plusieurs centaines d'atmosphères, on obtient un liquide doué d'un pouvoir antirabique très appréciable. Ce mode de traitement rappelle une expérience assez curieuse de W. Barratt (8). Ce savant, ayant imaginé de soumettre à l'action de l'air liquide dans le broyeur de Mac Fadyan un cerveau rabique, s'aperçut qu'il perdait sa virulence au bout de quelques heures. Heller (9) reprit cette expérience et obtint des résultats semblables, que Barratt prétendit expliquer par une destruction mécanique du virus de la rage, hypothèse difficilement acceptable.

Les propriétés que nous avons découvertes dans le suc céré-

(1) Sans vouloir entrer ici dans une discussion d'ordre chimique, nous tenons seulement à rappeler les critiques formulées par Duclaux (ces *Annales*, t. VI) contre ces dénominations conventionnelles de la matière albuminoïde, une même substance ayant peut-être reçu, en raison de certaines réactions, des noms très différents. Est-il besoin de faire remarquer en outre que les propriétés d'un albuminoïde isolé après la mort ne peuvent donner qu'une idée approchée de l'énergie qu'il possède dans le cerveau vivant.



bral nous conduisent à proposer de cette expérience une toute autre interprétation. En effet, on peut admettre que l'action mécanique du broyage a libéré, par suite d'une destruction profonde des éléments nerveux, la substance active, antirabique, de même que leur compression à plusieurs centaines d'atmosphères l'avait mise en liberté dans notre mode de préparation. Barratt signale, il est vrai, une série d'essais desquels il conclut que la perte de la virulence n'est pas due à un pouvoir antirabique de la masse broyée, mais ils ne sont rien moins que probants : d'une part, il recherche si cette dernière exerce une action neutralisante sur une émulsion virulente décimale, donc beaucoup trop concentrée ; d'autre part, il faut se rappeler que la substance active n'a pas été isolée par le broyage, mais est restée au sein de la masse, fixée sur le virus. Pour isoler cette substance, on doit faire subir à la matière nerveuse la préparation que nous avons décrite et qui nous a permis d'obtenir le principe antirabique du cerveau sous la forme d'un nouvel albuminoïde cérébral.

Cette forme sous laquelle nous le préparons lui permet d'échapper aux processus de coagulation par la chaleur qui pourraient lui enlever ses propriétés antirabiques ; aussi peut-on chauffer l'acidalbuminoïde à 80 et même à 100 degrés sans lui voir perdre son pouvoir neutralisant.

La dessiccation paraît avoir sur notre substance une action plus intense que sur les extraits cérébraux, sur le suc de presse, qui renferment le principe actif. A plusieurs reprises, nous avons pu comparer l'action sur l'émulsion rabique d'un même précipité isolé du cerveau normal avant et après sa dessiccation sous le vide sulfurique et ainsi constater que cet albuminoïde en se desséchant avait perdu une partie de ses propriétés neutralisantes.

Ces faits sont intéressants, car ils se rapportent aux résultats opposés que l'on obtient suivant que les moelles rabiques sont desséchées lentement d'après le procédé de Pasteur, ou bien d'une façon rapide ; on sait que, dans ce dernier cas, elles conservent intacte leur virulence.

Harris et Shackell (de Saint-Louis, États-Unis) ont repris (10) récemment cette question, sur laquelle ils professent les mêmes idées que nous. Ce n'est pas la dessiccation des moelles qui at-

ténue leur virulence, mais bien la façon dont elle est conduite : menée rapidement, elle n'altérera pas l'activité du virus; abandonnée lentement à elle-même, elle le neutralisera peu à peu en déterminant une concentration croissante du principe antirabique contenu normalement dans la substance nerveuse.

La perte de la virulence, dans le procédé des moelles pasteuriennes, est donc de nature chimique et c'est en s'opposant à l'action de l'albuminoïde actif sur le virus que la dessiccation brusque lui conserve tout son pouvoir infectant. Nos recherches sur les propriétés biologiques des albuminoïdes du cerveau apportent, pensons-nous, une confirmation expérimentale à cette manière de voir.

Il était indiqué de rechercher ce que deviennent les propriétés spécifiques de l'acidalbuminoïde cérébral chez les animaux ayant succombé à la rage ainsi que chez ceux vaccinés contre elle. Déjà nous avons constaté une activité plus grande dans les extraits cérébraux chez une personne ayant succombé à la rage. Nos recherches sur l'acidalbuminoïde, qui ont porté sur plus de 80 expériences, concordent toutes pour révéler le fait suivant extrêmement suggestif : le pouvoir neutralisant de cette substance isolée du cerveau, assez faible chez l'animal neuf, augmente chez celui qui a succombé à l'infection rabique, et acquiert une énergie considérable chez les animaux vaccinés contre la rage. Ainsi, tandis que l'acidalbuminoïde extrait du cerveau de mouton neuf rend inactif environ son volume d'une émulsion centésimale de virus fixe, on voit la même quantité de cet acidalbuminoïde préparé avec la substance nerveuse d'un mouton rabique neutraliser 5 ou 6 volumes de la même dilution virulente. Mais du cerveau des animaux vaccinés on peut isoler un albuminoïde autrement actif; en voici quelques exemples.

Un mouton traité depuis plusieurs années par des injections hebdomadaires de virus fixe a fourni un extrait cérébral dont une partie neutralisait 15 parties de l'émulsion virulente centésimale. Chez un autre animal de la même espèce, nous avons pu isoler du cerveau la même substance douée, cette fois, d'une énergie surprenante, puisqu'elle neutralisait 40 fois son volume de la dilution virulente; le sérum de ces deux moutons était extrêmement actif (11).

TABLEAU III

ACTION NEUTRALISANTE DE L'ACIDALBUMINOÏDE  
EXTRAIT DE CERVEAUX D'ANIMAUX RABIQUES ET D'ANIMAUX VACCINÉS CONTRE LA RAGE.

ANIMAUX	INOCULATION INTRACÉRÉBRALE	RÉSULTATS
1. Cobaye.	Acidalbuminoïde de cerveau de lapin rabique + VF 1 p. 100 PE . . . . .	∞
2. Lapin.	1 partie d'acidalbuminoïde de cerveau de mouton rabique + 3 parties VF 1 p. 100. . . . .	∞
3. Lapin.	1 partie d'acidalbuminoïde du cerveau de mouton rabique + 6 parties VF 1 p. 100 . . . . .	∞
4. Lapin.	1 partie d'acidalbuminoïde du cerveau de mouton vacciné + 10 parties VF 1 p. 160 . . . . .	∞
5. Lapin.	1 partie du même acidalbuminoïde + 17 parties VF 1 p. 100. . . . .	Rage.
6. Cobaye.	1 partie d'acidalbuminoïde d'un autre mouton vacciné + 20 parties VF 1 p. 100 . . . . .	∞
7. Lapin.	1 partie du même acidalbuminoïde + 40 parties VF 1 p. 100 . . . . .	∞

Après avoir établi l'activité de l'acidalbuminoïde chez les animaux ayant acquis une immunité artificielle, il était intéressant de l'étudier chez des espèces qui jouissent d'un certain état réfractaire à la rage. Nous avons montré (12) que les oiseaux adultes rentrent dans cette catégorie d'animaux : un très petit nombre seulement présentent une ou plusieurs attaques de paralysie longtemps après la trépanation, quelques-uns même peuvent guérir définitivement.

Or, si l'on prépare notre substance albuminoïde en partant du cerveau de poules neuves, on constate qu'elle se montre plus active que chez les mammifères normaux. Dans nos essais, elle neutralisait de 4 à 5 fois son volume d'émulsion rabique. De ces faits, nous rapprocherons nos autres observations faites à propos de l'étude de la rage chez les oiseaux : état d'immunité naturelle très prononcé, guérison définitive d'un certain nombre des animaux paralysés, impossibilité d'obtenir un sérum antirabique très actif chez les oiseaux.

Pour rappeler le pouvoir neutralisant du virus rabique par la substance albuminoïde que nous avons isolée du cerveau, nous proposons de lui donner provisoirement le nom d'*antilyssine* (de *αντι* et *λυσσα*, rage).



Son pouvoir spécifique est en effet très étroit. Son action sur la toxine tétanique est nulle : qu'il s'agisse de substance cérébrale ou médullaire d'animaux neufs ou tétaniques, ou même d'animaux immunisés contre le tétanos, en aucun cas nous n'avons observé la moindre atténuation de la tétanotoxine par l'albuminoïde actif sur le virus de la rage.

Voici un autre exemple de la spécificité d'action de cette substance. On sait que le virus de la poliomyélite se rapproche par certains traits du virus rabique; mais, de même que du sérum antirabique reste sans influence sur le virus de la maladie de Heine-Medin, de même aussi l'albuminoïde extrait de cerveau humain et si actif sur le virus de la rage n'exerce pas la plus légère action sur celui de la poliomyélite (13) (1).

## II. — PROPRIÉTÉS TOXIQUES.

Après avoir étudié les propriétés neutralisantes spécifiques des extraits cérébraux, il nous faut maintenant montrer que, dans certaines conditions, les albuminoïdes de la substance nerveuse sont doués d'un pouvoir toxique plus ou moins intense.

Le point de départ de nos recherches avait été l'observation suivante, déjà ancienne (14) : quand on injecte à des animaux des émulsions de matière cérébrale filtrées sur bougie, ils en sont fortement éprouvés, perdent rapidement de leur poids et succombent parfois dans un état marastique. Nous avons alors montré le premier (15) que si l'on précipite en masse par le sulfate d'ammoniaque pur les albuminoïdes d'une émulsion de cerveau filtrée sur bougie, on obtient une substance qui, injectée dans l'encéphale, après dialyse, se montre fortement toxique pour les animaux : ils succombent, souvent après avoir présenté des phénomènes convulsifs survenant par crises et d'une incubation variable.

De même, le suc cérébral que l'on prépare en soumettant un encéphale à l'action d'une presse peut être, comme nous l'avons indiqué, desséché et repris par l'eau de façon à avoir une solution isotonique qui, filtrée sur bougie Chamberland, se montre également douée d'un pouvoir toxique, variable suivant

(1) L'acidalbuminoïde cérébral n'exerce aucune action neutralisante sur un autre microorganisme « invisible », celui de la vaccine.

sa provenance. Ainsi, l'extrait d'un cerveau rabique, celui d'encéphale de paralytiques généraux, se montrent incomparablement plus toxiques que d'autres.

Enfin, dans notre procédé d'extraction des nucléoprotéines du cerveau, on obtient encore des substances douées d'une toxicité souvent élevée.

Qu'il s'agisse donc d'une précipitation en masse par le sulfate d'ammoniaque, du suc de presse ou de préparations nucléoprotéiniques, toujours on constate que ces différentes préparations exercent sur les animaux un pouvoir toxique plus ou moins élevé, assez comparable dans ses effets.

Pour tenter de l'analyser, nous avons entrepris son étude en suivant la technique définie ci-dessus pour l'obtention de notre acidalbuminoïde. De la sorte, nous avons pu nous convaincre, au moyen d'injections intracérébrales, de la toxicité présentée par les différentes formes sous lesquelles ce procédé nous offre la matière albuminoïde du cerveau.

Le point essentiel de ces recherches nous paraît être le suivant : les préparations sont nettement plus toxiques avec un cerveau rabique qu'avec un cerveau normal. De même nous avons pu constater, à plusieurs reprises, que l'acidalbuminoïde extrait d'encéphales de paralytiques généraux, et de celui d'une épileptique morte en état de mal, était beaucoup plus toxique ; dans ces derniers cas, le caractère convulsif des troubles présentés par les animaux fut des plus accusés et d'une durée inaccoutumée.

Ici, une objection se présente immédiatement. Le concept toxicité est quelque chose de très relatif ; quand il s'agit d'inoculations dans un organe aussi sensible que le cerveau, et lorsque la substance ne se montre active pour l'organisme qu'après un tel mode d'introduction, on ne saurait rien conclure de précis, à moins de pouvoir provoquer les accidents spécifiques d'empoisonnement avec des quantités tout à fait minimales, ce qui n'est pas le cas pour nos extraits qui se montrent actifs aux doses relativement élevées de 0,50, 0,25, 0,10 cent. cubes.

L'étude des propriétés toxiques des albuminoïdes du cerveau offrirait donc peu d'intérêt si les choses se présentaient ainsi. Mais nous allons montrer que l'une de ces substances, le *nucléo-protéide* cérébral, est douée d'un pouvoir toxique en injection

intravcineuse, et que l'*acidalbuminoïde* du cerveau est susceptible de se comporter comme un antigène, qu'ainsi on peut obtenir un sérum capable de neutraliser ses propriétés.

Récemment, Dold, reprenant des expériences anciennes, a montré (16) que si l'on injecte dans les veines d'un lapin une émulsion concentrée du cerveau de cette espèce ou d'une autre, l'animal succombe en l'espace de quelques minutes, mais que si l'on a pris soin de chauffer l'émulsion à 60 degrés ou bien de l'additionner de sérum frais, l'animal n'éprouve aucun dommage de l'inoculation.

Nous allons prouver le rôle essentiel du *nucléoprotéide* du cerveau dans la genèse de ces accidents.

A un premier lot de lapins, on injecte dans les veines une dilution épaisse de substance cérébrale de la même espèce : ils meurent en quelques minutes. Un deuxième lot reçoit semblablement la même émulsion, chauffée une heure à 60 degrés : les animaux survivent, de même que ceux d'un troisième lot, inoculés avec une émulsion de cerveau additionnée d'un sérum (sérum antirabique).

Dans une deuxième expérience, l'émulsion de l'organe est remplacée par son nucléoprotéide préparé en la précipitant par l'acide acétique. Les lapins succombent trois-quatre minutes après avoir présenté les mêmes accidents que dans la première expérience ; ceux qui ont reçu le nucléoprotéide chauffé à 60 degrés résistent, de même que ceux injectés avec le mélange nucléoprotéide + sérum.

De ces expériences, il résulte que la toxicité des extraits aqueux du cerveau est due au nucléoprotéide (17).

Si maintenant on cherche à obtenir un sérum actif contre les propriétés toxiques de l'*acidalbuminoïde* du cerveau, on peut y parvenir à la condition de soumettre les animaux à des inoculations répétées à de courts intervalles. Un chien, qui avait reçu onze injections sous-cutanées de l'*acidalbuminoïde* de cerveau de mouton, a fourni un sérum (1) qui neutralisait non seulement les propriétés toxiques de cet albuminoïde, mais aussi son pouvoir antirabique.

L'étude des propriétés toxiques de l'*acidalbuminoïde* du cerveau, c'est-à-dire de la substance qui présente une affinité élective pour le virus de la rage, soulève la question de la toxine rabique.

Son existence n'a jamais été démontrée par la méthode expé-

(1) Ce sérum ne contient pas de précipitines, mais l'addition d'une minime quantité de l'*acidalbuminoïde* suffit pour y provoquer instantanément la formation d'un coagulum, phénomène rappelant les faits observés par Cantacuzène avec la pepsine (*Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, t. LXV, p. 271)



rim mentale et les accidents qui ont été attribués à l'action de ce poison peuvent tout aussi bien l'être à celle des substances albuminoïdes de la matière nerveuse normale. D'autre part, ce que nous savons des propriétés fixatrices du cerveau vis-à-vis d'une toxine, celle du tétanos, nous porte à supposer que le poison rabique doit être retenu par les cellules cérébrales assez énergiquement pour résister à tout mode d'extraction connu.

Si la méthode expérimentale n'est pas encore parvenue à démontrer la présence de la toxine rabique, l'étude clinique de cette psychose aiguë qu'est la rage nous révèle toute une symptomatologie extrêmement complexe et difficilement explicable sans l'hypothèse d'un poison spécifique. L'évolution même de la maladie à la suite d'une trépanation impose l'idée d'une toxine : ainsi, dès le troisième jour, après une injection intracérébrale de virus fixe, on peut constater la virulence du bulbe, et cependant l'animal manifestera seulement cinq jours plus tard les premiers symptômes visibles consistant en ataxie, tremblement de la tête, excitation ou torpeur, signes témoignant incontestablement d'une action d'un poison sur les centres. Or, puisque nous savons maintenant que l'encéphale renferme un albuminoïde doué *in vitro* d'une grande affinité pour le virus, nous sommes conduit logiquement à supposer que cette même substance doit l'exercer aussi dans le cerveau vivant.

Au moment de la culture du microbe rabique dans les centres, on peut supposer que certains éléments cellulaires de l'encéphale, neurones ou cellules de la névroglie (1), vont réagir en produisant un excès de l'albuminoïde, et c'est ce qui explique pourquoi l'on trouve celui-ci en plus grande quantité dans les cerveaux rabiques. Une partie de cet excès d'albuminoïde pourra, soit par son action sur les microbes rabiques libérer leur toxine, soit en se combinant avec elle, provoquer l'ensemble des symptômes que les auteurs ont, avec raison, considérés comme ceux d'une intoxication nerveuse spécifique.

(1) van Gehuchten est porté à considérer comme une réaction de défense du neurone les lésions de chromatolyse (si intenses dans la rage), centrale et périphérique, sans qu'il puisse dire s'ils sont primitifs ou secondaires. (*Anatomie du système nerveux*, t. I, p. 339.)

D'autre part, J. Mawas (*Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 2 juillet 1910, p. 45), tend à reconnaître une structure et une signification glandulaires aux cellules névrogliques chez les vertébrés.

S'il en est ainsi, si la présence d'un excès de cette substance albuminoïde dans le cerveau à un moment donné de l'incubation rabique joue un certain rôle dans l'éclosion des accidents toxiques, c'est-à-dire des signes visibles de la rage, ne pourrait-on pas hâter leur apparition, les provoquer à une époque où ils n'existent pas encore d'ordinaire chez les animaux qui ont reçu du virus dans l'encéphale?

On injecte à deux lapins et à deux cobayes un peu de cerveau de passage sous les méninges; quatre jours plus tard, ces animaux reçoivent, dans la même région (1) une quantité d'acidalbuminoïde très inférieure à la dose toxique, et que l'on inocule semblablement à deux lapins et à deux cobayes témoins. Ces derniers animaux ne présentent rien d'anormal consécutivement à l'injection; au contraire, les lapins et les cobayes, qui avaient été infectés préalablement avec le virus fixe, sont pris, trois le lendemain et le quatrième au bout de quarante-huit heures, de titubation, de parésie, de tremblement de la tête, puis graduellement des signes de la rage confirmée à laquelle ils succombent dans les délais normaux. Ainsi, tandis que les symptômes rabiques n'éclatent jamais avant le 8<sup>e</sup> jour après la trépanation, l'inoculation d'une dose, inoffensive par elle-même, de l'acidalbuminoïde a suffi pour les faire apparaître plusieurs jours avant l'échéance normale. Mais ces faits ne se passent pas toujours avec la même régularité et leur déterminisme nous échappe en partie.

L'hypothèse, que nous venons de formuler et que l'expérience paraît confirmer, tend à considérer une substance, élaborée dans un but de protection des éléments nobles, comme participant elle-même à la genèse des accidents rabiques; autrement dit, l'action de l'albuminoïde, neutralisante *in vitro*, serait, au sein de l'organisme, favorisante de la toxi-infection.

Dans nos expériences de neutralisation du virus par la substance active, nous n'avons jamais observé de phénomènes toxiques résultant de l'inoculation des mélanges neutres virus + acidalbuminoïde, excepté dans certains cas où nous faisons usage d'extraits cérébraux préparés avec l'encéphale d'animaux hyperimmunisés: la substance albuminoïde active

(1) Une deuxième trépanation n'a aucune action fâcheuse pour les animaux.

existant dans leur cerveau en plus grande quantité, il en persistait une dose suffisante pour être toxique. On est donc amené à se demander comment ces animaux hypervaccinés ne sont pas eux-mêmes intoxiqués par le développement d'une substance douée d'une aussi grande activité. La réponse à cette question, qui pourrait se poser pour d'autres produits toxiques de l'organisme, est fournie par ce fait, déjà signalé plus haut, que l'acidalbuminoïde se comporte comme un antigène et que l'on peut accoutumer à son action des animaux dont le sérum finit ainsi par acquérir un pouvoir spécifique à la fois contre la toxicité et contre les propriétés antirabiques de cette substance.

On prépare deux mélanges à P. E., le premier de l'acidalbuminoïde de mouton et de sérum de chien neuf, le deuxième du même acidalbuminoïde et de sérum de chien immunisé contre lui. Après vingt-quatre heures de séjour à la glacière, on ajoute à chaque mélange la moitié de son volume de virus fixe au centième et on inocule les deux préparations dans le cerveau de deux lots de lapins; ceux au sérum neuf demeurent bien portants, ceux au sérum du chien traité par l'acidalbuminoïde prennent la rage sans retard : le sérum renfermait donc un anticorps de l'albuminoïde cérébral (17).

Cette propriété du sérum d'un animal traité par cette substance nous paraît être d'importance, car, en même temps qu'elle précise l'action spécifique de l'acidalbuminoïde, elle permet d'expliquer comment la vie des animaux immunisés contre la rage est compatible avec la présence d'une substance aussi active, si bien qu'ils se trouvent en quelque sorte vaccinés contre elle et qu'en définitive il doit en résulter pour eux l'état d'équilibre organique nécessaire.

Au cours de l'immunisation contre la rage, il se produit des phénomènes nécessairement complexes parmi lesquels nous constatons, dans le temps : une réaction leucocytaire puissante, l'apparition des propriétés antirabiques dans les humeurs, enfin chez les animaux soumis à des vaccinations prolongées, celle de l'immunité cellulaire, active, de leur cerveau.

Quelles sont les relations qui existent entre les deux premiers et le dernier de ces actes? Nous ne sommes pas en état de le dire, mais seulement ceci. Quant on soumet à l'épreuve de la trépanation une série d'animaux vaccinés contre la rage, la plupart d'entre eux succombent à l'infection rabique bien que leur sérum soit souvent très actif. Quelques-uns résistent à cette épreuve; chez eux la cellule nerveuse est



pour longtemps immunisée et le virus introduit dans leur cerveau paraît bien s'y trouver détruit. N'est-il pas logique d'admettre que l'albuminoïde spécifique, impuissant chez l'animal neuf ou insuffisamment vacciné, à s'opposer longtemps à la culture du virus rabique, s'est, au cours d'une immunisation prolongée, développé au point de devenir efficace au sein de l'encéphale lui-même? Dans cette hypothèse, le microbe de la rage ne trouve plus dans le cerveau des animaux hyperimmunisés un milieu de culture favorable, mais se trouve soumis à une digestion par certains éléments cellulaires de l'encéphale et à une destruction par l'acidalbuminoïde. La proportion de cette substance, énorme relativement à la petite quantité de virus introduit au sein du cerveau chez les animaux hyperimmunisés que l'on soumet à l'épreuve de la trépanation, expliquerait pourquoi la destruction du virus par l'acidalbuminoïde ne s'accompagne pas généralement des accidents toxiques que nous avons supposés résulter de l'action exercée par lui sur la substance rabique.

L'activité si considérable que nous avons constatée dans les extraits du cerveau des animaux vaccinés nous paraît donc capable d'expliquer en partie le mécanisme de l'immunité acquise par l'encéphale, immunité que l'on a vue durer bien au delà des propriétés antirabiques des humeurs.

#### OUVRAGES CITÉS.

- (1) A. MARIE et M. TIFFENEAU, *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXII, p. 289 et 644, et t. XXVI, p. 348.
- (2) A. MARIE, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, t. LV, p. 1290.
- (3) REMLINGER, *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XII, p. 834.
- (4) A. MARIE, *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. CXLIX, p. 234.
- (5) HALLIBURTON, *Journ. of physiology*, t. XV, p. 90.
- (6) LEVENE, *Arch. neur. et psych.*, t. II, I. 1899,
- (7) A. MARIE, *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. CL, p. 1775. et *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, t. LXX, p. 332.
- (8) W. BARRATT, *Proc. Roy. Soc.* t. LXXII, p. 353.
- (9) OTTO HELLER, *Die Schutzimpfung gegen Lyssa*, Fischer, Iena.
- (10) HARRIS et SHACKELL, *Journ. of inf. dis.*, t. VIII, p. 47.
- (11) A. MARIE, *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. CLII, p. 1514 et *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, t. LXXI, p. 709.
- (12) A. MARIE, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, t. LVI, p. 373.
- (13) LEVADITI, *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXV, 25 novembre 1911.
- (14) A. MARIE, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, t. LV, p. 1290.
- (15) A. MARIE, *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. CXLI, p. 394.
- (16) DOLD, *Zeits. f. Immun. u. exp. Therapie*, t. X, p. 53.
- (17) A. MARIE, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, t. LXXII, p. 400 et 528.

## ÉTUDES SUR LES ENGRAIS CATALYTIQUES

par E. BOULLANGER

Depuis le jour où G. Bertrand et Thomassin ont fait connaître les résultats remarquables obtenus en grande culture par l'emploi du sulfate de manganèse comme engrais, de nombreuses expériences ont été entreprises sur les engrais manganésés et sur d'autres engrais catalytiques en France, en Allemagne, en Suède, en Belgique, en Hollande, en Italie, au Japon : elles ont conduit le plus souvent à des résultats favorables ; cependant certains expérimentateurs n'ont obtenu que des résultats négatifs.

Il nous a semblé intéressant de faire l'étude de cette question au moyen des méthodes très précises de la culture en pots, car ces méthodes permettent de placer tous les essais dans des conditions rigoureusement identiques, de les rendre ainsi parfaitement comparables, d'éliminer les influences perturbatrices des variations atmosphériques et de multiplier enfin les essais pour avoir d'un seul coup une vue d'ensemble sur les modifications de la récolte sous l'action des engrais catalytiques.

Les méthodes de cultures en pots que nous avons adoptées sont celles du professeur Wagner, de Darmstadt, qui sont suffisamment connues des agronomes pour qu'il soit inutile de les décrire ici.

Nos expériences ont porté d'abord, en 1908, sur les pommes de terre, et nous avons expérimenté avec le chlorure de manganèse sur deux terres différentes, une terre pauvre, siliceuse, et une terre riche, argileuse. Les engrais ont été incorporés directement à la terre au moment de la préparation de chaque pot. Seul, le chlorure de manganèse a été dissous dans un litre d'eau et la terre a été arrosée avec ce liquide. Les résultats fournis par cet essai sont réunis dans le tableau suivant : les chiffres correspondent à la récolte moyenne d'un pot (moyenne des six pots que comportait chaque série).

	POIDS DES TUBERCULES en grammes	
	Terre pauvre.	Terre riche.
1 <sup>o</sup> Sans engrais et sans $\text{MnCl}^2$ . . . . .	438	682
2 <sup>o</sup> $\text{MnCl}^2$ seul : 1 gr. par pot. . . . .	468	903
3 <sup>o</sup> $\text{SO}^4(\text{AzH}^4)^2$ : 20 gr.; $\text{KCl}$ : 8 gr.; superphosphate : 30 gr. par pot. . . . .	832	892
4 <sup>o</sup> Engrais complet de la 3 <sup>e</sup> série, plus 1 gr. de $\text{MnCl}^2$ par pot . . . . .	1115	981
Poids de la terre employée pour chaque pot : 40 kil.		

On voit que le chlorure de manganèse a augmenté partout le poids de la récolte, mais cette augmentation se manifeste différemment dans la terre pauvre et dans la terre riche. Dans la terre pauvre et en l'absence d'engrais, le chlorure de manganèse n'a donné qu'une augmentation de récolte assez faible sur le témoin; au contraire, en présence d'engrais complet, l'augmentation de rendement a été considérable, puisqu'elle atteint 34 p. 100 sur la série correspondante sans manganèse. Dans la terre riche, l'action du manganèse a été très nette, même en l'absence d'engrais; le manganèse seul, sans autre engrais, donne en effet une augmentation de récolte de plus de 32 p. 100 sur le témoin sans manganèse; en présence d'engrais complet, le manganèse a encore exercé une action, mais plus faible, car l'accroissement de récolte n'est plus que de 10 p. 100 environ sur la série correspondante sans manganèse.

Ces faits semblent montrer que le manganèse, qui permet une utilisation plus active des éléments fertilisants du sol, agit différemment suivant la richesse des sols en ces éléments. Si le sol est pauvre, l'influence du manganèse reste faible et elle n'apparaît nettement que lorsqu'on ajoute au sol les éléments fertilisants qui lui manquent. Si le sol est riche, le manganèse agit aussitôt puisque la plante peut disposer d'aliments abondants; en présence de fortes doses d'engrais, il y a encore accroissement de récolte sous l'influence du manganèse, mais cet accroissement est proportionnellement plus faible, car il y a évidemment une limite à l'assimilation par la plante.

Ces expériences sur les pommes de terre ont été reprises un peu différemment en 1909, sur une terre riche, dont chaque pot a reçu 40 kilogrammes. Les résultats obtenus sont réunis



dans le tableau suivant, dont les chiffres indiquent le rendement d'un pot, en prenant la moyenne des six essais de chaque série.

	POIDS DES TUBERCULES en grammes.
1° Sans engrais . . . . .	334
2° $\text{MnCl}^2$ seul : 2 gr. par pot . . . . .	462
3° $\text{SO}^4(\text{AzH}^4)^2$ seul : 15 gr. par pot . . . . .	455
4° $\text{SO}^4(\text{AzH}^4)^2$ : 15 gr.; $\text{MnCl}^2$ : 2 gr. par pot . . . . .	524
5° $\text{SO}^4(\text{AzH}^4)^2$ : 16 gr.; superphosphate : 25 gr. par pot. . . . .	500
6° $\text{SO}^4(\text{AzH}^4)^2$ : 15 gr.; superphosphate : 25 gr.; $\text{MnCl}^2$ : 2 gr. par pot. . . . .	592
7° $\text{SO}^4(\text{AzH}^4)^2$ : 15 gr.; $\text{KCl}$ : 7 gr. par pot . . . . .	520
8° $\text{SO}^4(\text{AzH}^4)^2$ : 15 gr.; $\text{KCl}$ : 7 gr.; $\text{MnCl}^2$ : 2 gr. par pot. . . . .	600
9° $\text{SO}^4(\text{AzH}^4)^2$ : 15 gr.; $\text{KCl}$ : 7 gr.; superphosphate : 25 gr. par pot. . . . .	674
0° $\text{SO}^4(\text{AzH}^4)^2$ : 15 gr.; $\text{KCl}$ : 7 gr.; superphosphate : 25 gr.; $\text{MnCl}^2$ : 2 gr. par pot. . . . .	760

Les résultats obtenus dans ces expériences confirment ceux de l'année précédente. L'augmentation de récolte se manifeste dans tous les cas, mais, comme dans les expériences de 1908, elle est proportionnellement moins élevée en présence qu'en l'absence d'engrais.

D'autres essais ont été entrepris en 1909 sur l'action du manganèse, sur l'orge de brasserie. Nous avons employé la même terre riche que pour nos expériences sur les pommes de terre; on en a placé 7 kilogrammes dans chaque pot. Les résultats obtenus sont réunis dans le tableau suivant: ils représentent le rendement moyen d'un pot dans chaque série.

	POIDS DU GRAIN en grammes.	POIDS DE LA PAILLE en grammes.
1° Sans engrais . . . . .	10,5	16,5
2° $\text{MnCl}^2$ seul : 0,15 gr. par pot. . . . .	9,8	17,4
3° $\text{KCl}$ : 1,6 gr. par pot . . . . .	11,4	17,0
4° $\text{KCl}$ : 1,6 gr.; $\text{MnCl}^2$ : 0,15 gr. par pot. . . . .	10,4	17,6
5° $\text{KCl}$ : 1,6 gr.; $\text{SO}^4(\text{AzH}^4)^2$ : 4 gr. par pot. . . . .	21,05	37,0
6° $\text{KCl}$ : 1,6 gr.; $\text{SO}^4(\text{AzH}^4)^2$ : 4 gr.; $\text{MnCl}^2$ : 0,15 gr. par pot. . . . .	20,4	38,1
7° $\text{KCl}$ : 1,6 gr.; superphosphate : 6 gr. par pot. . . . .	12,5	18,5
8° $\text{KCl}$ : 1,6 gr.; superphosphate : 6 gr.; $\text{MnCl}^2$ : 0,15 gr. par pot. . . . .	11,4	18,7
9° $\text{KCl}$ : 1,6 gr.; superphosphate : 6 gr.; $\text{SO}^4(\text{AzH}^4)^2$ : 4 gr. par pot. . . . .	22,2	43,9
10° $\text{KCl}$ : 1,6 gr.; superphosphate : 6 gr.; $\text{SO}^4(\text{AzH}^4)^2$ : 4 gr.; $\text{MnCl}^2$ : 0,15 gr. par pot. . . . .	25,95	49,7

Ces chiffres montrent que l'action du chlorure de manganèse sur l'orge de brasserie a été nulle dans la plupart des cas. La récolte en grain est même en général un peu inférieure, avec addition de manganèse, à celle des témoins sans manganèse. L'inverse se produit pour les récoltes en paille, mais les différences sont très faibles. Le manganèse ne semble avoir agi qu'en présence de l'engrais complet, où on observe un excédent de récolte de près de 17 p. 100 pour le grain, et de 13 p. 100 pour la paille. Mais il ne faut pas perdre de vue que ces méthodes de cultures en pots réalisent en quelque sorte des conditions idéales de culture, et fournissent toujours des résultats amplifiés ; en pratique, l'augmentation de récolte serait beaucoup moins considérable.

Une nouvelle série d'expériences a été entreprise en 1910, et a porté sur l'avoine, les pois et le trèfle. Dans ces expériences, nous avons utilisé, au lieu du chlorure de manganèse, les engrais manganésés des mines de Las Cabesses (Ariège), et notamment le manganose et la chaux manganésée. Les essais ont eu lieu sur une terre argileuse riche : chaque pot en a reçu 7,5 kilogs. Des expériences préliminaires et très réduites, entreprises l'année précédente, avaient semblé indiquer que le manganèse exerçait une action favorable surtout en présence des engrais potassiques : nous avons donc particulièrement dirigé nos études dans cette voie.

1<sup>o</sup> *Expériences sur l'avoine.* — Dans cette série, tous les engrais, azotés, phosphatés, potassiques ou manganésés ont été incorporés directement à la terre de chaque pot au moment de la préparation du pot. Les résultats obtenus sont réunis dans le tableau suivant, dont les chiffres donnent la récolte moyenne d'un pot dans chaque série.

L'influence des engrais manganésés est très nette et se manifeste partout. L'augmentation de rendement est en général assez faible pour la paille ; elle atteint cependant 17 p. 100 avec le manganose seul sur la série sans engrais, et dépasse 12 p. 100 avec la chaux manganésée en présence d'engrais potassique sur la série correspondante sans chaux manganésée. Mais en présence d'engrais complet, l'accroissement de la récolte de paille est faible. L'influence des engrais manganésés est beaucoup

plus forte sur la récolte de grain, ce qui est bien conforme aux résultats de G. Bertrand. L'augmentation de la récolte de grain sous l'action du manganèse, déjà sensible dans la série sans engrais et dans la série avec engrais potassique seul, où elle atteint 15 à 22 p. 100, devient considérable en présence d'engrais potassique et d'engrais azoté (plus de 45 p. 100) ou en présence d'engrais complet (27 p. 100 pour le manganose, 44 p. 100 pour la chaux manganésée).

	POIDS DU GRAIN en grammes.	POIDS DE LA PAILLE en grammes.
1° Sans engrais. . . . .	4,2	22,2
2° Manganose seul : 1 gr. par pot. . . . .	5,0	26,15
3° Chaux manganésée seule : 1 gr. par pot. . . . .	4,6	21,3
4° KCl : 0,5 gr. par pot. . . . .	5,3	20,75
5° KCl : 0,5 gr.; manganose : 1 gr. par pot. . . . .	6,1	21,2
6° KCl : 0,5 gr.; chaux manganésée : 1 gr. par pot. . . . .	6,0	23,2
7° KCl : 0,5 gr.; $\text{SO}^4(\text{AzH}^4)^2$ : 1 gr. par pot. . . . .	5,1	31,45
8° KCl : 0,5 gr.; $\text{SO}^4(\text{AzH}^4)^2$ : 1 gr.; manganose : 1 gr. par pot. . . . .	7,4	31,75
9° KCl : 0,5 gr.; $\text{SO}^4(\text{AzH}^4)^2$ : 1 gr.; chaux manganésée : 1 gr. par pot. . . . .	7,55	32,10
10° KCl : 0,5 gr.; superphosphate : 2 gr. par pot. . . . .	5,05	22,3
11° KCl : 0,5 gr.; superphosphate : 2 gr.; manganose : 1 gr. par pot. . . . .	6,15	24,2
12° KCl : 0,5 gr.; superphosphate : 2 gr.; chaux manganésée : 1 gr. par pot. . . . .	6,25	23,8
13° KCl : 0,5 gr.; superphosphate : 2 gr.; $\text{SO}^4(\text{AzH}^4)^2$ : 1 gr. par pot. . . . .	5,95	32,0
14° KCl : 0,5 gr.; superphosphate : 2 gr.; $\text{SO}^4(\text{AzH}^4)^2$ : 1 gr.; manganose : 1 gr. par pot. . . . .	7,6	32,8
15° KCl : 0,5 gr.; superphosphate : 2 gr.; $\text{SO}^4(\text{AzH}^4)^2$ : 1 gr.; chaux manganésée : 1 gr. par pot. . . . .	8,45	32,6

2° *Expériences sur les pois.* — Nous avons employé, pour ces essais, des pois nains qui viennent parfaitement en pots. On s'est borné à déterminer la récolte de pois écosés, qu'on a fait sécher avant de les peser. Les résultats obtenus ont été les suivants.

Ces expériences nous amènent aux mêmes conclusions que les expériences sur les avoines; mais l'influence du manganèse est encore plus considérable ici. On voit, en effet, que dans les séries 4, 5, 6, 10, 11, 12, la récolte peut être doublée par le



manganèse, sans aucun apport d'engrais azoté. En présence d'engrais azoté, les accroissements de récolte, quoique toujours élevés, sont cependant moins considérables. On voit que la simple addition de manganose ou de chaux manganésée aux engrais potassiques, permet d'obtenir un rendement presque aussi élevé qu'avec l'engrais complet sans manganèse.

POIDS DES GRAINS  
en grammes.

1° Sans engrais . . . . .	2,25
2° Manganose seul : 1 gr. par pot . . . . .	3,05
3° Chaux manganésée seule : 1 gr. par pot. . . . .	3,35
4° KCl : 0,5 gr. par pot. . . . .	2,25
5° KCl : 0,5 gr.; manganose : 1 gr. par pot. . . . .	4,25
6° KCl : 0,5 gr.; chaux manganésée : 1 gr. par pot . . . . .	4,50
7° KCl : 0,5 gr.; $\text{SO}^4\text{AzH}^4{}^2$ : 1 gr. par pot . . . . .	5,00
8° KCl : 0,5 gr.; $\text{SO}^4\text{AzH}^4{}^2$ : 1 gr.; manganose : 1 gr. par pot . . . . .	5,90
9° KCl : 0,5 gr.; $\text{SO}^4\text{AzH}^4{}^2$ : 1 gr.; chaux manganésée : 1 gr. par pot. . . . .	6,00
10° KCl : 0,5 gr.; superphosphate : 2 gr. par pot. . . . .	2,25
11° KCl : 0,5 gr.; superphosphate : 2 gr.; manganose : 1 gr. par pot . . . . .	4,40
12° KCl : 0,5 gr.; superphosphate : 2 gr.; chaux manganésée : 1 gr. par pot. . . . .	4,80
13° KCl : 0,5 gr.; superphosphate : 2 gr.; $\text{SO}^4\text{AzH}^4{}^2$ : 1 gr. par pot. . . . .	5,20
14° KCl : 0,5 gr.; superphosphate : 2 gr.; $\text{SO}^4\text{AzH}^4{}^2$ : 1 gr.; manganose : 1 gr. par pot. . . . .	5,60
15° KCl : 0,5 gr.; superphosphate : 2 gr.; $\text{SO}^4\text{AzH}^4{}^2$ : 1 gr.; chaux manganésée : 1 gr. par pot . . . . .	6,10

3° *Expériences sur le trèfle.* — Ces expériences ont été faites avec le trèfle blanc, sur 7 kil. 5 de terre. Les résultats obtenus sont réunis dans le tableau suivant, dont les chiffres indiquent le poids moyen de la récolte sèche d'un pot de chaque série :

POIDS DE LA RÉCOLTE SÈCHE  
en grammes.

1° Sans engrais . . . . .	20,30
2° Manganose seul : 1 gr. par pot. . . . .	20,30
3° Chaux manganésée seule : 1 gr. par pot . . . . .	20,00
4° $\text{SO}^4\text{AzH}^4{}^2$ : 1 gr. par pot . . . . .	19,90
5° $\text{SO}^4\text{AzH}^4{}^2$ : 1 gr.; manganose : 1 gr. par pot. . . . .	19,90
6° $\text{SO}^4\text{AzH}^4{}^2$ : 1 gr.; chaux manganésée : 1 gr. par pot. . . . .	20,50
7° Superphosphate de chaux : 2 gr. par pot. . . . .	20,10
8° Superphosphate : 2 gr.; manganose : 1 gr. par pot. . . . .	20,05
9° Superphosphate : 2 gr.; chaux manganésée : 1 gr. par pot. . . . .	20,05
10° KCl : 0,5 gr. par pot . . . . .	22,20
11° KCl : 0,5 gr.; manganose : 1 gr. par pot . . . . .	26,70
12° KCl : 0,5 gr.; chaux manganésée : 1 gr. par pot . . . . .	30,60

Nous voyons que les engrais manganésés n'ont exercé aucune action sensible, soit seuls, soit en présence d'engrais azoté ou d'engrais phosphaté. Mais l'action en présence d'engrais potassique est très accentuée puisque la récolte augmente de 20 p. 100 avec le manganose et de 37 p. 100 avec la chaux manganésée. Nous retrouvons donc ici une action analogue à celle que nous avons observée pour l'avoine et pour les pois, où les engrais manganésés ont surtout agi en présence des engrais potassiques. Ces résultats expliquent en outre certains insuccès qu'on peut avoir dans l'emploi des engrais manganésés : on voit que le manganèse n'agit pas toujours et qu'il est nécessaire, pour que son action se manifeste, que certaines conditions de nutrition minérale, variables, sans doute, avec les diverses cultures, soient réalisées. En général, la présence d'engrais potassiques paraît être un adjuvant de l'action du manganèse.

Les études qui précèdent nous ont engagé à étendre, dans le cours de l'année 1914, nos recherches sur les engrais manganésés à certaines plantes potagères et à y joindre l'étude d'autres substances telles que le sulfate d'alumine, le silicate de soude, le sulfate ferrique, le sulfate d'uranium et le soufre en fleur. Cette étude a porté sur les carottes, les haricots, les céleris, les laitues, les oseille, les chicorées, les pommes de terre, les oignons et les épinards.

Pour les carottes, les haricots et les céleris, les expériences ont été divisées en quatre séries : la première n'a reçu aucun engrais, la seconde n'a reçu comme engrais qu'un des engrais catalytiques signalés plus haut, la troisième a reçu un engrais complet composé, pour 30 kilogrammes de terre, d'un gramme d'azote sous la forme de sulfate d'ammoniaque, d'un gramme d'acide phosphorique sous la forme de superphosphate de chaux et d'un gramme de potasse sous la forme de chlorure de potassium ; la quatrième a reçu le même engrais complet, additionné d'un des engrais catalytiques énumérés précédemment. Les doses d'engrais catalytiques ont été de 1 gramme pour 30 kilogrammes de terre, sauf pour le soufre en fleur où la dose a été seulement de 0 gr. 7. Pour les autres cultures, les essais n'ont porté que sur les deux premières séries, à cause du matériel considérable que demandent de semblables études.

L'engrais complet et le soufre ont été incorporés directement à la terre au moment de la préparation de chaque pot : les engrais catalytiques ont été ajoutés en solution dans les 500 cent. cubes d'eau d'arrosage, avant les semailles. Pour chaque essai, on a disposé plusieurs pots semblables, afin d'avoir une mesure plus certaine de l'influence moyenne de chaque substance.

Les résultats obtenus dans ces divers essais sont réunis dans les tableaux suivants. Ils sont évalués en grammes par pot.

1 <sup>o</sup> SULFATE D'ALUMINE									
	Carottes.	Haricots (grains).	Céleris.	Epinards.	Laitues.	Oseilles.	Chicorées.	Oignons.	Pommes de terre.
Témoin sans engrais . . . . .	560	17,9	360	79	133	137	218	84	207
Sulfate d'alumine sans engrais .	613	18,7	442	78	147	142	241	96	293
Témoin avec engrais complet . .	615	19,7	398	109	»	»	»	»	»
Sulf. d'alumine av. engrais comp.	749	19,5	537	122	»	»	»	»	»
2 <sup>o</sup> SULFATE DE MANGANÈSE									
	Carottes.	Haricots (grains).	Céleris.	Epinards.	Laitues.	Oseilles.	Chicorées.	Oignons.	Bettleraves.
Témoin sans engrais . . . . .	560	17,9	360	79	133	137	218	84	570
Sulf. de manganèse sans engrais.	626	15,8	464	86	190	176	212	88	711
Témoin avec engrais complet . .	615	19,7	398	109	»	»	»	»	675
Sulf. de mang. av. engrais comp.	698	21,8	568	116	»	»	»	»	786
3 <sup>o</sup> SILICATE DE SOUDE									
	Carottes.	Haricots (grains).	Céleris.	Epinards.		Oseilles.	Chicorées.	Oignons.	Pommes de terre.
Témoin sans engrais . . . . .	560	17,9	360	79		137	218	84	207
Silicate de soude sans engrais . .	628	15,8	517	41		99	206	82	279
Témoin avec engrais complet . .	615	19,7	398	109		»	»	»	»
Silic. de soude avec engrais com.	656	19,9	557	82		»	»	»	»

4° SULFATE DE FER									
	Carottes.	Haricots (grains).	Céleri.	Epinards.	Laitues.	Oseilles.	Chicorées.	Oignons.	Pommes de terre.
Témoin sans engrais. . . . .	560	17,9	360	79	133	137	218	84	207
Sulfate de fer sans engrais . . .	555	16,8	550	70	162	77	192	96	273
Témoin avec engrais complet . .	615	19,7	398	109	»	»	»	»	»
Sulfate de fer avec engrais comp.	635	20,9	706	94	»	»	»	»	»
5° SOUFRE EN FLEUR									
	Carottes.	Haricots (grains).	Céleri.	Laitues.	Oseilles.	Chicorées.	Epinards.	Oignons.	Pommes de terre.
Témoin sans engrais. . . . .	560	17,9	360	133	137	218	79	84	207
Soufre sans engrais . . . . .	646	19,5	635	246	222	266	96	95	249
Témoin avec engrais complet . .	615	19,7	398	»	»	»	»	»	»
Soufre avec engrais complet. . .	745	25,2	676	»	»	»	»	»	»
6° SULFATE D'URANIUM									
	BETTERAVES								
Témoin sans engrais. . . . .	570								
Sulfate d'uranium sans engrais. . . . .	645								
Témoin avec engrais complet . . . . .	675								
Sulfate d'uranium avec engrais complet. . . . .	849								

Nous pouvons tirer des expériences qui précèdent les conclusions suivantes :

L'action du sulfate d'alumine est considérable sur la carotte, le céleri et la pomme de terre, la chicorée et l'oignon ; elle est douteuse sur le haricot, l'épinard et l'oseille.

L'action du sulfate de manganèse est considérable sur la carotte, le céleri, la laitue, l'oseille et la betterave ; elle est sensible sur l'épinard, elle est douteuse ou nulle sur l'oignon, la chicorée et le haricot.

L'action du silicate de soude est considérable sur le céleri et



la pomme de terre, très sensible sur la carotte, nulle sur l'oignon et la chicorée, nuisible sur l'épinard et l'oseille.

L'action du sulfate de fer est considérable sur le céleri et la pomme de terre, sensible sur la laitue et l'oignon, nulle ou douteuse sur la carotte et le haricot, nuisible sur l'épinard, l'oseille et la chicorée.

L'action du soufre en fleur est favorable partout : elle est surtout considérable sur la carotte, le céleri, la laitue, l'oseille et la pomme de terre.

Enfin le sulfate d'uranium semble agir très favorablement sur la betterave.

Si nous envisageons maintenant chaque culture, nous pouvons grouper pour chacune d'elles les engrais catalytiques de la façon suivante, par ordre d'activité décroissante, en laissant de côté ceux qui n'agissent pas ou agissent défavorablement.

Carotte : soufre, sulfate d'alumine, sulfate de manganèse, silicate de soude.

Haricot : soufre.

Céleri : Soufre, sulfate de fer, silicate de soude, sulfate de manganèse, sulfate d'alumine.

Epinard : Soufre.

Laitue : Soufre, sulfate de manganèse, sulfate de fer, sulfate d'alumine.

Oseille : Soufre, sulfate de manganèse.

Chicorée : Soufre, sulfate d'alumine.

Pomme de terre : Sulfate d'alumine, silicate de soude, sulfate de fer, soufre. Nous avons vu dans la première partie de ce mémoire que les sels de manganèse agissent aussi très favorablement sur cette plante.

Oignon : légère action favorable avec le sulfate d'alumine, le sulfate de fer et le soufre.

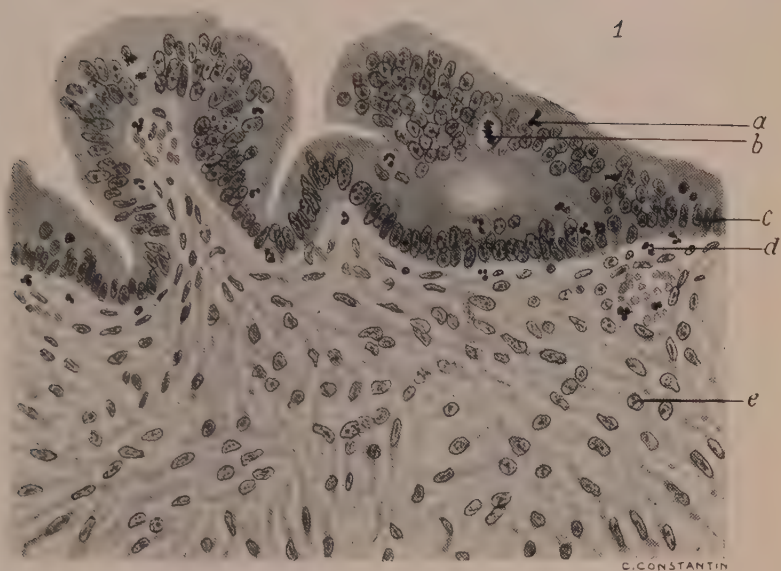
Une dernière expérience a été faite pour chercher à déterminer le mécanisme par lequel le soufre en fleur exerce son action favorable.

Deux pots ont reçu, l'un 7 kilogrammes de terre, l'autre la même quantité additionnée de 0 gr. 16 de soufre en fleur. Deux autres pots ont été stérilisés au flambeau, ainsi que deux lots de 7 kilogrammes de terre : un de ces lots

a reçu, après stérilisation, 0 gr. 16 de soufre en fleur ; le mélange du soufre et de la terre a été fait dans une cuvette stérile et la terre a été placée ensuite dans un pot stérilisé ; l'autre lot de terre a été introduit directement, sans soufre, dans le second pot stérilisé et la terre a été ramenée, dans les deux pots, à son humidité normale avec de l'eau stérile. On a ensemencé les quatre pots avec des graines de cressonnette stérilisées. Les deux cultures en milieu stérilisé ont été placées sous de grandes cloches de verre également stériles ; elles ont été aérées dans le cours de l'expérience avec de l'air filtré sur coton, et arrosées avec de l'eau stérile. Les deux autres pots, en milieu non stérilisé, sont restés à l'air libre. Les récoltes ont été les suivantes.

	GRAMMES
Pot témoin, milieu non stérilisé . . . . .	15,50
Pot avec soufre, milieu non stérilisé . . . . .	25,40
Pot témoin, milieu stérilisé . . . . .	14,80
Pot avec soufre, milieu stérilisé . . . . .	15,60

On voit que l'action du soufre est considérable en terre non stérilisée, et qu'elle est très faible en terre stérile. Il est donc probable que le soufre n'agit qu'indirectement en modifiant la flore bactérienne du sol et en entravant le développement de certains organismes. Nous procédons actuellement à de nouvelles expériences pour élucider le mécanisme de cette action du soufre.



$\frac{250}{1}$







# **DE LA VÉSICULE BILIAIRE ENVISAGÉE COMME LIEU D'INOCULATION**

## **CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'IMMUNITÉ ET A LA PHYSIOLOGIE GÉNÉRALE**

par HENRI VIOLLE  
de la marine de guerre.  
(Avec les planches XII et XIII.)  
(Suite et fin.)

### **EFFETS FAVORABLES OU DÉFAVORABLES DE L'INTRODUCTION DANS LA VÉSICULE BILIAIRE DE SUBSTANCES CHIMIOTACTIQUES POSITIVES OU NÉGATIVES POUR LES LEUCOCYTES**

Dans le but de reconnaître le rôle joué par l'afflux leucocytaire dans la vésicule, nous avons étudié l'effet de diverses substances ayant sur les globules blancs, les unes une action chimiotactique positive, les autres une action chimiotactique négative. Nous avons vu que l'adjonction à un milieu de culture de bouillon, d'eau peptonée, ou de glucose dans la proportion de 1 p. 100, en favorisant la leucocytose, aide puissamment à la production d'anticorps. Il en serait de même avec l'essence de térébenthine, mais celle-ci a une action bactéricide trop puissante pour qu'on puisse l'employer.

1° *Exemple* : Lapin, n° 73, inoculé le 5 octobre, reçoit dans la vésicule biliaire 1 centimètre cube d'eau physiologique contenant en suspension deux cultures de vibrions sur gélose de 24 heures à 37 degrés; on a ajouté à la dilution 6 gouttes de térébenthine.

L'agglutination, 10 jours après l'opération, s'élève à 1 p. 100. A l'autopsie, faite 20 jours après, on constate que la vésicule est très légèrement hypertrophiée, renfermant dans son intérieur des leucocytes; il n'y a pas de vibrions; par contre, la térébenthine est restée en très grande partie non résorbée.

2° *Exemple* : Lapin, n° 79, inoculé le 30 septembre, reçoit dans la vésicule 1/2 centimètre cube de térébenthine et 1/2 cen-

timètre cube de bouillonensemencé extemporanément avec une culture cholérique.

Le sérum présente un taux agglutinatifs'élevant dans les 15 premiers jours à 1 p. 500, pour redescendre à 1 p. 50, 30 jours après. A l'autopsie, faite à cette époque : absence de vibrions dans la vésicule.

Lorsque nous avons étudié les anticorps (1), apparaissant à la suite d'inoculations intravésiculaires d'hématies de mouton,

nous citons les résultats obtenus, toutes choses égales d'ailleurs, dans les cas suivants : le premier, où les hématies sont injectées seules en milieu isotonique (eau physiologique), le second, où elles sont en milieu chimiotactique négatif (acide lactique en solution à 1 p. 100), le troisième, où elles sont mélangées à des corps possédant un pouvoir chimiotactique positif (spores de charbon tuées). Les résultats sont conformes, dans ces trois cas, aux règles générales.

Le pouvoir hémolytique du

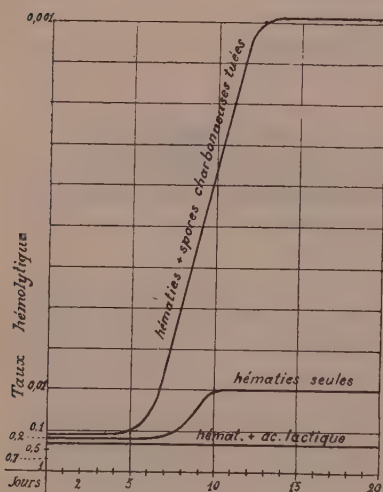


FIG. 5.

atteint 1 p. 10; dans le second, il reste égal à ce qu'il était auparavant; dans le troisième, il s'élève à 1 p. 100.

Mais si, dans l'exemple que nous avons pris précédemment, le fait d'ajouter une substance repoussant les leucocytes permet de comprendre pourquoi le pouvoir hémolytique reste invariablement au taux qu'il possédait antérieurement, puisque les hématies n'ont pas été détruites, il est difficile d'expliquer comment, avec une substance favorisante, le pouvoir hémolytique s'élève et devient supérieur à ce qu'il eût été sans l'adjonction de cette substance.

Peut-être faut-il admettre, ce qui semble d'accord avec les

(1) Voir *Thèse*, page 78.

constatations faites à l'autopsie, que, dans le premier cas, les leucocytes n'ont pas détruit intégralement toutes les hématies, tandis que, dans le second, cette désintégration a été complète, poussée jusqu'à la disparition totale de tout vestige hémétique.

Inversement, les substances chimiotactiques négatives, en repoussant les leucocytes, empêcheront toute formation d'anticorps. L'addition de sels de quinine, d'acide lactique, etc., en quantité extrêmement faible, à la culture inoculée dans la vésicule, entravera l'élaboration, même minime, de substances immunisantes; et ces résultats sont constants, quel que soit l'antigène considéré : bactérien, cellulaire ou albumineux.

Les expériences venant à l'appui de cette hypothèse seront décrites en détail dans la deuxième partie de ce travail, principalement aux chapitres, « Choléra » et « Bacille tuberculeux ».

## DEUXIÈME PARTIE

Ayant vu dans leur ensemble les modifications apportées dans les humeurs à la suite d'inoculations antigéniques intravésiculaires, nous allons, dans la deuxième partie de ce mémoire, nous arrêter plus spécialement sur quelques cas, et apprécier les transformations humorales subies par l'organisme, consécutivement à l'inoculation d'antigènes, soit bactériens, dont l'évolution dans l'organisme est rapide : *Vibron cholérique*, *Bacille typhique*, *Coli-bacille*, ou moins intense : *Bacille tuberculeux*.

### CHOLÉRA

Dans ce chapitre, nous dirons un mot des *Inoculations intraveineuses* de vibrion cholérique; puis nous aborderons les *Inoculations intravésiculaires*, conférant l'immunisation active, et les *Inoculations intravésiculaires, suivies d'injections intraveineuses*, lesquelles contrôlent cette vaccination et permettent l'hyperimmunisation.

Nous terminerons par la description des *Propriétés du liquide vésiculaire*, et surtout des *Propriétés du sérum* : action de coagulation et de lyse *in vitro* et *in vivo* conférant l'immunité passive.

## INOCULATIONS INTRAVEINEUSES.

Avec les cultures que nous avons utilisées (1), l'inoculation intraveineuse de vibriion cholérique (3/4 à 1 tube de culture sur gélose de 18 à 24 heures à 37 degrés, dilué dans quelques centimètres cubes d'eau physiologique) a toujours déterminé la mort chez le lapin adulte. La mort survenait généralement quelques heures après l'injection (2).

A l'autopsie, les lésions varient suivant que la mort est survenue très rapidement ou un certain temps après l'injection. Dans le premier cas, on ne constate aucune lésion; dans le second, on note une congestion intense uniforme de l'intestin grêle, à contenu diarrhéique, donnant à l'organe une coloration rose et rarement hortensia, une congestion légère du cæcum et de l'appendice, accompagnée de piqueté hémorragique extrêmement net, particulièrement saisissant et fréquent dans ce dernier organe. Le péritoine est très vascularisé, et un liquide, plus ou moins clair et en plus ou moins grande abondance, remplit la cavité péritonéale.

## INOCULATIONS INTRAVÉSICULAIRES.

L'inoculation intravésiculaire de vibriions cholériques vivants et virulents ne provoque point la mort de l'animal. Les vibriions utilisés provenaient de culture sur gélose à 37 degrés et âgés de 18 à 24 heures. La quantité que nous inoculions était très variable : dans nos premières expériences, nous inoculâmes des doses extrêmement élevées, un tube de culture totale; les résultats furent, quelquefois, la mort de l'animal par septicémie en 36, 48 ou 52 heures; donc avec un retard très net sur les témoins. Plus tard, nous diminuâmes notablement la quantité de culture et nous remplaçâmes le milieu primitif neutre par du bouillon, ou mieux de l'eau peptonée. Finalement, nous ensemencions extempo-

(1) Culture provenant de l'Institut Pasteur, et portant la mention : Vibriion cholérique. Dnieper, due, ainsi que les autres, à l'obligeance de M. LEGROUX.

(2) Dans un certain nombre de cas, la mort survint quelques minutes après l'inoculation. Elle était due, selon toute probabilité, aux toxines contenues dans le liquide injecté et non au milieu de culture (gélose) inoffensif chez les animaux témoins.



ranément 1 centimètre cube d'eau peptonée avec une ôse de culture cholérique de 24 heures à 37 degrés et nous inoculions le mélange, pour ainsi dire à « l'état naissant », dans la vésicule.

Les symptômes présentés chez les animaux inoculés intravésiculairement se réduisent à peu près à rien. On note, dans les 24 à 36 heures qui suivent l'opération, une très légère élévation de température et un peu d'abattement, mais le choc opératoire consécutif à une laparotomie peut suffisamment expliquer des phénomènes d'ailleurs légers et fugaces.

A l'autopsie, on ne constate aucune lésion organique; tous les organes sont normaux, comme aspect extérieur, coloration, poids, etc. La vésicule biliaire seule présente des modifications qui sont analogues à celles que nous avons décrites dans la première partie de cet ouvrage, et sur lesquelles nous ne reviendrons point.

#### INOCULATIONS INTRAVÉSICULAIRES SUIVIES D'INJECTIONS INTRAVEINEUSES.

L'injection intraveineuse de culture de vibrions vivants et virulents chez un lapin vacciné intravésiculairement ne déchaîne aucun phénomène morbide, alors que les animaux témoins meurent en l'espace de quelques heures par intoxication cholérique.

Les expériences ayant conduit à cette formule, maintes fois répétées, ont toujours donné des résultats identiques, que nous pouvons résumer ici en prenant un type moyen.

*Exemple* : Lapin n° 79, inoculé dans la vésicule le 30 septembre avec 1/2 centimètre cube de bouillonensemencé extemporanément avec une culture cholérique de 24 heures sur gélose à 37 degrés.

Le 3 novembre, c'est-à-dire un mois plus tard, inoculation intraveineuse de 1 tube de culture cholérique de 48 heures sur gélose à 37 degrés diluée dans 10 centimètres cubes d'eau physiologique.

L'animal témoin, lapin n° 56, meurt en hypothermie 6 heures après l'injection intraveineuse de vibron cholérique, avec les signes d'intoxication cholérique suraiguë.

Le lapin n° 79, vacciné, ne présente aucune réaction de poids et de température, soit immédiatement, soit plusieurs heures ou plusieurs jours après l'injection intraveineuse.

On peut en déduire qu'il était suffisamment vacciné pour supporter sans réagir une dose mortelle de culture cholérique.

Les résultats n'ont pas toujours été aussi typiques. Il faut que l'animal soit suffisamment immunisé et la valeur de cette immunisation peut échapper, puisque aucun moyen de contrôle n'existe pour la mettre en évidence, si ce n'est précisément l'injection intraveineuse. Cependant l'agglutination paraît fournir quelques données précieuses ; et si, sur les 22 animaux mis en expérience, 2 inoculés intravésiculairement, puis secondairement dans les veines, sont morts, encore qu'avec un retard très prononcé sur les témoins l'agglutination aurait pu peut-être permettre de prévoir cet échec, puisque le taux agglutinatif du sérum ne s'était élevé un mois après l'inoculation intravésiculaire qu'à 1 p. 25.

Mais ce ne sont là que des exceptions et, d'une façon générale, tout animal suffisamment vacciné intravésiculairement, c'est-à-dire présentant un sérum capable d'agglutiner à 1 p. 100, pourra supporter, lorsque ce taux sera atteint, c'est-à-dire 8 à 12 jours après l'inoculation, une dose mortelle intraveineuse de vibrions.

#### HYPERIMMUNISATION.

Si quelques jours après, au même animal, on refait une nouvelle injection intraveineuse avec la même dose de vibron cholérique, on arrive à produire une hyperimmunisation très nette.

*Exemple* : Lapin n° 38, le 30 mai, inoculation intravésiculaire de bouillon ensemencé avec une culture cholérique ; il ne présente aucune réaction générale.

Le 3 juillet, il reçoit en injection intraveineuse un tube de culture de vibron sur gélose à 37 degrés de 24 heures.

Le 6 juillet, nouvelle injection identique à la précédente ; réaction fébrile pendant 24 heures.

L'animal à la suite de cette double injection est totalement immunisé. Le taux de l'agglutination de son sérum passe, en l'espace de quelques jours, de 1 p. 100 à 1 p. 30.000. Ce sérum

offre des propriétés immunisantes très prononcées, comme nous allons le voir dans le chapitre suivant.

#### PROPRIÉTÉS DU LIQUIDE VÉSICULAIRE.

Nous savons que la vésicule biliaire présente en son intérieur, bientôt après l'inoculation cholérique, un liquide blanc crémeux, plus ou moins épais suivant l'époque d'inoculation, et ne renfermant plus de vibrions après un temps relativement court. Les frottis sur lames, les ensemencements en eau peptonée et les inoculations demeurent toujours négatifs.

Toutefois, un point paraît intéressant : ce liquide, dépourvu alors de bactéries, lourdement chargé de globules blancs, dont quelques-uns sont en voie de dégénérescence, dont les autres sont encore en pleine activité (la proportion des uns aux autres variant en sens inverse au fur et à mesure que l'on s'éloigne de la date d'inoculation), n'est pas un liquide indifférent, neutre.

Si l'on inocule à un cobaye (cobaye 53) dans la cavité péritonéale, tout le contenu, âgé de 1 mois, de la vésicule biliaire d'un lapin, dont le sérum agglutine à 1 p. 500, l'animal ne présente aucune réaction générale. Mais si, 6 jours après, l'on inocule dans cette même cavité péritonéale quelques centimètres cubes d'eau physiologique, contenant en suspension 1/2 tube de vibron cholérique, âgé de 24 heures sur gélose à 37 degrés, l'animal ne présente, cette fois encore, aucune réaction.

Et cependant tout autre cobaye qui reçoit seulement cette demi-culture cholérique meurt certainement en l'espace de 18 à 24 heures. De même mourra tout cobaye dont l'inoculation vibrionienne, intrapéritonéale, sera précédée 6 jours auparavant de quelques gouttes d'un liquide favorisant l'hyperleucocytose, tel que 1 centimètre cube d'eau peptonée glucosée, comme on peut le constater par le tableau ci-après.

Le fait d'avoir fait précéder de 6 jours au moins l'injection vibrionienne par l'injection du liquide vésiculaire, doit faire écarter l'hypothèse d'une de ces hyperleucocytoses péritonéales si faciles à déterminer chez le cobaye, et également très rapide dans leur évolution, puisque, atteignant leur maximum vers

la vingtième heure, elles sont totalement évanouies vers le 3<sup>e</sup> jour.

INJECTIONS INTRAPÉRITONÉALES		
1 <sup>er</sup> jour.	7 <sup>e</sup> jour.	Résultats.
Liquide vésiculaire.	Vibron cholérique (dose mortelle).	Vivant.
Eau peptonée glucosée.	Id.	Mort en 18 heures.
Pas d'injection.	Id.	Id.

#### PROPRIÉTÉS DU SÉRUM.

Le sérum, obtenu par les procédés cités dans les chapitres précédents, présente les propriétés que l'on rencontre dans tout sérum immunisant, préparé avec les corps bactériens et avec des toxines.

Il diffère donc des sérums anticholériques obtenus habituellement par ce fait qu'il est non seulement antibactérien, mais également antitoxique.

Avec ces deux propriétés fondamentales, se manifestent d'une part, les pouvoirs agglutinants, bactéricides et sensibilisateurs, d'autre part, le pouvoir précipitant que nous avons déterminés par les méthodes habituelles.

*Pouvoir antibactérien.* — (Bactério-agglutinines et sensibilisatrices ou philocytases, ou ambocepteurs; et alexines, ou cy-tases, ou compléments, ou lysines.)

Le sérum protège le cobaye contre la péritonite cholérique (expérience positive de Koch). Si on injecte à un cobaye dans le péritoine 1/2 culture de vibrions cholériques sur gélose à 37 degrés de 18 heures et diluée dans 2 centimètres cubes d'eau physiologique, on sait que l'animal meurt en 18 à 24 heures en hypothermie, après avoir présenté du collapsus et des convulsions. A l'autopsie, on trouve un intestin congestionné, teinte hortensia, et du liquide péritonéal en plus ou moins grande abondance.

EXPÉRIENCE 1. — Si l'on ajoute à une dilution semblable de vibrions 2 centimètres cubes de sérum, et que l'on mette ce



mélange à l'éluve à 37 degrés durant 1 heure, on peut l'inoculer dans la cavité péritonéale d'un cobaye, sans déterminer la mort, ou même sans provoquer de phénomènes réactionnels.

EXPÉRIENCE II. — Il en sera de même si le sérum a été injecté seul dans le péritoine 24 heures avant la culture. Les vibrions sont agglutinés, transformés en granules, dissous partiellement (phénomène de Pfeiffer). Ces résultats étaient à prévoir d'après les réactions *in vitro*. Mais, bien que celles-ci soient extrêmement nettes et généralement intenses, on ne peut nullement en déduire la valeur thérapeutique ou préventive d'un sérum, puisque « le sérum d'un animal fortement immunisé est toujours plus agglutinant *in vitro* qu'il n'est préventif vis-à-vis de la péritonite vibrionienne, plus antitoxique vis-à-vis de l'intoxication cholérique expérimentale qu'il n'est précipitant *in vitro*. Cela veut dire, en d'autres termes, que le pouvoir préventif n'est pas fonction exclusive du pouvoir agglutinant, comme le pouvoir antitoxique n'est pas fonction du pouvoir précipitant ». (Salimbeni.)

EXPÉRIENCE III. — Enfin, lorsque l'inoculation de sérum est faite préventivement sous la peau, les résultats sont encore positifs.

*Exemple* : Inoculation sous-cutanée à un cobaye, 48 heures avant l'injection intrapéritonéale vibrionienne, de 5 centimètres cubes de sérum agglutinant *in vitro* à 1 p. 2.000. L'animal résiste ; le témoin meurt.

Toutefois, l'on sait que rien n'est plus facile que de protéger le cobaye contre la péritonite cholérique. Il suffit de lui injecter dans la cavité péritonéale au préalable quelques gouttes de bouillon, d'eau peptonée, d'eau glucosée, ou simplement d'eau physiologique. On détermine ainsi une arrivée de leucocytes *in situ* capables d'enrayer l'évolution morbide. D'autre part, la réaction péritonéale n'est point proportionnelle à la virulence du vibron. L'expérience II n'est donc pas probante. Au contraire, les expériences I et surtout III conservent toute leur valeur.

Une expérience beaucoup plus sévère consiste à faire les réactions sur des lapins en procédant par inoculation intraveineuse.

Si on injecte dans la veine marginale de l'oreille d'un lapin

un mélange laissé préalablement 1 heure à l'étuve à 37 degrés et constitué par une culture de vibrions cholériques âgée de 18 heures sur gélose à 37 degrés, diluée dans 5 centimètres cubes d'eau physiologique et additionnée de 2 à 3 centimètres cubes de sérum immunisant, l'animal ne présente qu'une très faible réaction se traduisant par une légère hyperthermie durant quelques heures (1), et par un léger abattement. Puis il se remet complètement et définitivement.

Les témoins meurent dans l'espace de quelques heures en hypothermie, par suite d'intoxication et d'infection suraiguës.

Si, au lieu d'injecter d'emblée un mélange de sérum et de vibrions, on inocule, 24 heures avant l'injection intraveineuse de vibrions, le sérum en injection également intraveineuse, les résultats sont comparables : le témoin meurt ; l'animal immunisé survit, ayant peut-être présenté encore moins de phénomènes réactionnels que l'animal qui a reçu d'emblée le sérum et la culture mélangés.

Ces expériences permettent de dire que le sérum est nettement antibactérien, puisque, injecté préventivement, il est capable d'empêcher l'éclosion des phénomènes cholériformes provoqués par l'injection de cultures virulentes.

Ajoutons que l'animal qui a reçu le mélange : vibron + sérum, sans offrir de réaction générale, n'est point capable par contre de fournir un sérum doué de propriétés bactéricides. Son sang ne présente aucun des caractères des sérums immunisants : dans notre expérience, 12 jours après l'inoculation du mélange précité, ce sang ne renfermait ni agglutinines, ni précipitines, ni sensibilisatrices, ni antitoxines. Inoculé à cette époque avec une culture pure, vibronienne, identique à celle qu'il reçut la première fois, l'animal a conservé sa sensibilité antérieure vis-à-vis du choléra ; lui et le témoin se comportent de même, mourant tous deux en hypo-

(1) Lapin 31 :

Température avant l'injection . . . . .	39°5
1 heure après l'injection . . . . .	39°5
3 heures après l'injection . . . . .	41°8
5 — après l'injection . . . . .	41°
20 — après l'injection . . . . .	39°7
30 — après l'injection . . . . .	39°5
40 — après l'injection . . . . .	39°5

thermie, d'intoxication cholériforme avec lésions intestinales plus ou moins prononcées suivant la rapidité de l'évolution morbide.

Il en résulte que l'animal n'était pas immunisé, quoique ou plutôt précisément parce que le sérum ajouté aux vibrions ainsi sensibilisés était en trop grande quantité, et comme l'a dit Besredka (1) : « lorsqu'il se trouve en excès, les microbes injectés en même temps que lui traversent l'organisme sans que l'animal en garde le moindre souvenir ».

Autrement dit, dans ces conditions, la conservation de la sensibilité à l'intoxication cholérique, la mort lors d'une seconde injection vibriennienne, prouvent nettement que les principes toxiques et les vibrions contenus dans le mélange antérieur avaient été nettement détruits et neutralisés par ce sérum [expérience positive des réactions paradoxales de R. Pfeiffer et Friedberger] (2).

*Pouvoir antitoxique.* — Afin de déterminer le pouvoir antitoxique des sérums, nous avons eu recours à deux sortes d'expériences, en faisant agir le sérum sur :

1° La toxine préparée artificiellement;

2° La toxine fabriquée naturellement par l'organisme (choléra expérimental).

1° a) La méthode de Roux, Metchnikoff et Salimbeni pour la préparation de la toxine cholérique ne nous a fourni qu'un liquide très faiblement toxique; et cette toxicité très atténuée est peut-être due au pouvoir toxigène restreint du vibron que nous avions.

b) La méthode de Brau et Denier que nous employâmes ensuite nous a donné des résultats à peu près analogues.

Nous n'obtinmes jamais une toxine normale, moyenne, équivalente à celle de Salimbeni, c'est-à-dire déterminant la mort du cobaye par la seule injection sous-cutanée de 1 centimètre cube. Nous dûmes avoir recours à des doses 10 ou 20 fois plus fortes pour obtenir la mort en 48 à 52 heures, et dans quelques cas les témoins survécurent.

Toutefois, dans leur ensemble, en opérant sur un nombre relativement élevé de cobayes (16), nous pûmes nous rendre

(1) *Annales de l'Institut Pasteur*, 1902, p. 922.

(2) *Berliner klin. Wochenschrift*, 1902, n° 25.

compte que le mélange de sérum et de toxine était indifférent à l'animal, et que l'inoculation préventive de sérum empêchait tout développement de phénomènes morbides lors d'une injection de toxine faite 12 ou 24 heures après; les témoins, par contre, étaient sérieusement éprouvés, et un certain nombre mouraient.

c) L'autolysat de cultures cholériques d'après la méthode de Strong (1) nous a donné des résultats analogues, mais en employant également, vu le faible pouvoir toxigène de nos cultures, des doses beaucoup plus fortes que celles qui sont généralement usitées.

2° Nous essayâmes ensuite le sérum, non plus sur une toxine plus ou moins virulente et ne se rapprochant peut-être que vaguement des produits élaborés par le vibron cholérique au niveau de l'intestin et lancés de là dans l'organisme, mais sur l'animal atteint de choléra, c'est-à-dire précisément sur cette toxine diffuse en tous points.

Pour provoquer le choléra expérimental, nous employâmes le procédé de Metchnikoff (2), qui consiste, comme l'on sait, à faire ingérer à de jeunes lapins à la mamelle, âgés de 2 à 6 jours, des cultures cholériques associées à des espèces microbiennes favorisantes et principalement une sarcine et une torula (ou cryptococcus) à raison de 1 tube de culture de 18 heures à 37 degrés sur gélose, de chacune de ces bactéries : choléra, sarcine et torula. La mort arrive entre 40 et 60 heures, généralement en hypothermie; à l'autopsie, on trouve des lésions typiques congestives de l'intestin avec teinte hortensia de l'intestin grêle, rempli d'un contenu diarrhéique et de grains rizi-formes blanc jaunâtre ou jaune d'or; de la distension de la cavité abdominale contenant un liquide louche, séreux, etc.

La difficulté de nous procurer de petits lapins a limité le nombre de nos expériences; nous avons fait 5 essais que voici, brièvement résumés :

*Premier essai.* — 11 mai. Sérum frais, agglutinant à 1 p. 1.000, provenant du lapin n° 8 inoculé intravésiculairement 1 mois auparavant; ce sérum est injecté sous la peau à

(1) Publications of the bureau of government. Lab. biolog. laborat., n° 16, 1904, Manille.

(2) *Annales de l'Institut Pasteur*, 1894.



raison de 2,5 centimètres cubes par animal, 48 heures avant l'ingestion du mélange choléra-sarcine-torula.

Age des lapins au moment de l'ingestion : 52 heures.  
 Ayant reçu le sérum . . . . . 2 lapins.  
 Ayant reçu le choléra seul . . . . . 2 —  
 N'ayant reçu ni choléra ni sérum . . . . . 1 lapin.

Les 2 témoins (choléra seul) meurent, l'un 36, l'autre 48 heures après l'ingestion. Les 3 autres survécurent, indemnes.

*Deuxième essai.* — 8 novembre. Sérum frais agglutinant à 1 p. 2.500, provenant d'un lapin hyperimmunisé (inoculation intravésiculaire suivie de 2 injections intraveineuses). Ce sérum est inoculé à raison de 3,5 centimètres cubes sous la peau de chacun des animaux 48 heures avant l'ingestion du mélange (choléra-sarcine-torula).

Age des lapins au moment de l'ingestion : 36 heures.  
 Ayant reçu le sérum . . . . . 4 lapins.  
 Ayant reçu le choléra seul . . . . . 2 lapins.  
 N'ayant reçu ni sérum ni choléra . . . . . 1 lapin.

Les 2 témoins (choléra seul) meurent, l'un 24, l'autre 30 heures après l'ingestion, avec lésion cholérique typique. Un animal ayant reçu le sérum meurt 52 heures après l'ingestion cholérique. Les 4 autres survécurent, bien portants.

*Troisième essai.* — 12 novembre. Sérum frais, agglutinant à 1 p. 100 seulement, provenant d'un lapin immunisé intravésiculairement ; ce sérum est injecté sous la peau des lapins à raison de 2,5 centimètres cubes, 24 heures avant l'ingestion du mélange cholérique.

Age des lapins au moment de l'ingestion : 70 heures.  
 Ayant reçu le sérum . . . . . 3 lapins.  
 Ayant reçu le choléra seul . . . . . 1 lapin.  
 N'ayant reçu ni sérum ni choléra . . . . . 1 —

Les 4 premiers lapins meurent, le témoin en 24 heures et les autres en 36, 50 et 62 heures.

*Quatrième essai.* — 18 novembre. Sérum frais agglutinant à 1 p. 10.000 provenant d'un animal hyperimmunisé. Ce sérum est inoculé à raison de 4 centimètres cubes sous la peau, 12 heures avant l'ingestion du mélange.

Age des lapins au moment de l'ingestion : 28 heures.  
 Ayant reçu le sérum . . . . . 2 lapins.  
 Ayant reçu le choléra seul . . . . . 2 —

Les 2 témoins (choléra seul) meurent en 26, 30 heures.

Les 2 autres résistent, sans avoir présenté aucun symptôme morbide.

*Cinquième essai.* — 30 novembre. Sérum frais agglutinant identique à celui du quatrième essai. Ce sérum est inoculé à raison de 2 et 4 centimètres cubes sous la peau 2 heures et 12 heures avant l'ingestion du mélange.

Age des lapins au moment de l'ingestion : 32 heures.

Ayant reçu 2 cent. cubes de sérum (2 heures avant) . . . 2 lapins.

Ayant reçu 4 cent. cubes de sérum (12 heures avant). . . 2 —

Ayant reçu le choléra seul . . . . . 2 —

Les deux témoins meurent en 24 heures.

Des lapins ayant reçu le sérum 2 heures auparavant, l'un meurt, l'autre résiste. Les deux autres résistent également.

Nous ne devons point tenir compte du troisième essai. Un sérum agglutinant à 1 p. 100 seulement, n'ayant présenté aucune propriété antitoxique *in vitro*, ne devait point protéger contre l'intoxication cholérique expérimentale. Nous n'en fîmes l'essai que par la raison qu'au moment où nous eûmes à notre disposition ces jeunes lapins, nous n'avions pas d'autre sérum sous la main.

Il résulte donc, cet essai mis à part, que le sérum convenablement préparé est nettement antitoxique, non seulement *in vitro*, mais encore *in vivo*.

Le sérum obtenu par l'inoculation intravésiculaire de vibrions cholériques est donc doué de propriétés immunisantes. Il est antibactérien et antitoxique. Le fait est intéressant parce que tout sérum cholérique antitoxique est exclusivement obtenu au moyen d'inoculation de toxines cholériques (sérum de Metchnikoff, Roux et Salimbeni), préparées par injections de toxine cholérique dans les veines du cheval.

Le sérum de Pfeiffer, préparé avec des corps vibrioniens, a de très grandes propriétés bactéricides : il protège efficacement le cobaye contre la péritonite cholérique; par contre, il ne manifeste aucun pouvoir antitoxique : il ne paraît point pouvoir immuniser les jeunes lapins contre l'ingestion de vibrions.

Les expériences qui précèdent démontrent que l'on peut provoquer la formation d'antitoxines dans l'organisme d'un animal

qui ne reçoit en injections vaccinales que des corps microbiens, résultat à rapprocher de celui que l'on obtient avec le sérum antipesteux, également antitoxique et pourtant exclusivement préparé avec des bacilles pesteux.

### BACILLE TYPHIQUE

L'inoculation intravésiculaire de bacilles typhiques (1) provoque, chez l'animal auquel on a fait l'opération, la formation d'anticorps spécifiques.

*Exemple* : lapin n° 2, reçoit le 12 avril, dans la vésicule biliaire, 1 centimètre cube d'une culture de bacille d'Eberth en bouillon de 24 heures à 37 degrés.

Le 21 avril, c'est-à-dire 8 jours après l'inoculation, le sérum, qui avant l'opération ne présentait aucun pouvoir agglutinatif, agglutine à 1 p. 750, et le 29 avril à 1 p. 1.000.

Un lapin témoin, ayant reçu la même quantité de bacilles, mais en injection intrapéritonéale, présentait, 8 jours après, un taux agglutinatif n'atteignant point 1 p. 50.

L'animal, opéré intravésiculairement, ne montre à aucun moment des phénomènes réactionnels ; le poids, la température restent normaux.

4 mois après, le taux agglutinatif s'était maintenu à 1 p. 1.000 ; aucune des propriétés immunisantes n'avait disparu.

A cette époque, l'animal, bien portant, ayant augmenté de 400 grammes, est sacrifié. On ne trouve aucune lésion organique ; le foie, la rate, les reins, les poumons, le péritoine sont normaux. Mais la vue est attirée par la vésicule biliaire, formant une tumeur énorme, blanche, contrastant sur le fond rouge hépatique. Elle est de la grosseur d'un œuf de poule, à parois dures, blanches, fibreuses, épaissies. A l'intérieur de cette tumeur, on trouve le liquide habituel, décrit précédemment, mais en proportion inaccoutumée (40 cent. cubes) ; lesensemencements restent stériles.

Le sérum de ce lapin n° 2 a été essayé sur de jeunes lapins âgés de 1 mois et inoculés intrapéritonéalement avec des cultures typhiques, à raison de 3 et 4 centimètres cubes de culture en bouillon de 48 heures à 37 degrés. Le sérum avait été

(1) Culture provenant de l'Institut Pasteur.

inoculé l'avant-veille sous la peau à raison de 4 centimètres cubes, et dans la cavité intrapéritonéale à raison de 2 centimètres cubes.

Dans les 8 expériences faites, les 2 témoins moururent, 18 à 25 jours après, de cachexie, due sans doute à l'élaboration de toxines typhiques, tandis que les animaux, traités préventivement avec le sérum, survécurent.

Les bacilles que nous employâmes, malgré les tentatives d'exaltation de virulence par les passages en séries chez le cobaye et par des cultures en sacs (Chantemesse et Widal),

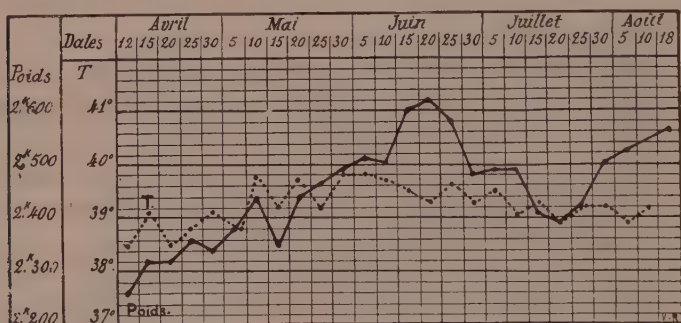


FIG. 6.

(Chantemesse et Balthazard), n'atteignirent jamais, quoique possédant des propriétés toxiques certaines, une virulence très grande ; ceci explique la mort lente des témoins.

Le même sérum, essayé comme agent neutralisateur de la toxine typhique, a donné des résultats analogues.

La toxine, préparée suivant la méthode de Conradi, tuait les témoins en injection intrapéritonéale, et préservait les animaux qui, dans la cavité péritonéale, avaient reçu 48 heures auparavant le sérum immunisant, ou recevaient extemporanément un mélange de sérum et de toxine laissé préalablement 2 heures à 37 degrés. Les animaux témoins moururent presque tous (4 sur 5) lentement, quoique la toxine fût injectée en quantité très grande : 5 centimètres cubes pour de jeunes lapins de 650 à 700 grammes ; on dépassait ainsi de beaucoup les doses mortelles employées par Conradi (0,2 cent. cube) en injection intrapéritonéale chez le cobaye.



Avant de terminer ce chapitre, rapportons un fait qui peut être rapproché de ceux que nous avons relatés précédemment, dans la première partie.

Le lapin n° 1, inoculé intravésiculairement le 12 avril, fournissait, 8 jours après l'opération, un sérum agglutinant à 1 p. 750. Les 15<sup>e</sup>, 20<sup>e</sup> et 30<sup>e</sup> jour, le taux agglutinatif était resté identique.

Le 1<sup>er</sup> juillet, c'est-à-dire après 2 mois et demi, le taux agglutinatif était redescendu à 1 p. 5, chiffre initial.

Le sérum du lapin n° 2 inoculé le même jour que le lapin n° 1 présente, un mois après l'opération, un pouvoir agglutinant égal à 1 p. 1.000, taux qu'il maintenait encore le 1<sup>er</sup> juillet.

A l'autopsie, le lapin n° 1 ayant été sacrifié, on remarque que tous les organes sont sains, mais que la vésicule biliaire n'offre pas les dimensions qu'on s'attendait à lui trouver; petite et recroquevillée, elle présente sur une de ses faces un pertuis, signe d'une rupture antérieure.

De ce fait, il semble résulter que les anticorps ne se fabriquent et ne restent en circulation dans l'organisme qu'autant que la vésicule qui les engendre subsiste indemne. Si, pour une cause quelconque, la vésicule se rompt, les antigènes se répandent dans la cavité péritonéale; là, surtout lorsque l'inoculation a eu lieu très longtemps avant, et qu'ils sont ou atténués ou en faible proportion, ils ne causent qu'une réaction infime et ils disparaissent résorbés ou éliminés. De nouveaux anticorps ne peuvent se former, et quant à ceux qui sont répandus dans l'organisme, ils ne tardent pas à disparaître également.

#### TUBERCULOSE AVIAIRE

Nous suivrons dans ce chapitre le même ordre que dans celui du choléra, étudiant d'abord les réactions consécutives aux *Injections intraveineuses*, puis aux *Inoculations intravésiculaires*, et aux *Inoculations intravésiculaires suivies d'injections intraveineuses*. Nous terminerons par la description des *Propriétés du sérum*.

Dans tous les cas qui vont être cités, les cultures employées furent toujours celles de bacilles de tuberculose aviaire (1)

(1) Ces cultures tuaient le cobaye en inoculation sous-cutanée, avec présence de bacilles dans les organes.

provenant de l'Institut Pasteur, et cultivées à 37 degrés.

Dans les premiers essais que nous fîmes, nous utilisâmes le bacille bovin, mais les réactions étant ou trop faibles ou inconstantes, et n'amenant pas, dans un laps de temps déterminé et relativement court, la mort chez les témoins, nous y renonçâmes.

Nous avons d'abord utilisé, tantôt des cultures sur pommes de terre glycinées à 5 p. 100, tantôt des cultures sur milieu de Lumière (foie de bœuf glyciné à 6 p. 100); plus tard, nous avons employé des cultures sur gélose glycinée à 5 p. 100.

D'ailleurs, la nature du milieu de culture sera indiquée à chaque observation.

#### INJECTIONS INTRA VEINEUSES.

Les animaux témoins au nombre de 11, inoculés en injection intraveineuse, sont tous morts dans une période comprise entre le 11<sup>e</sup> et le 22<sup>e</sup> jour.

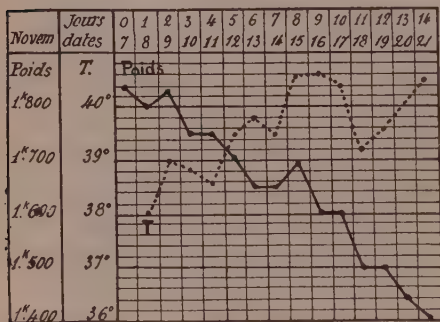


FIG. 7.

Les injections furent faites avec des cultures de tuberculose aviaire; une ou deux spatules de culture fraîche âgée de 1 à 2 mois et diluée dans 2 à 10 centimètres cubes d'eau physiologique.

Les symptômes constatés étaient généralement de l'amaigrissement, de l'anorexie, de l'abattement et une élévation de température, surtout les derniers jours (voir figure 7). A l'autopsie, les organes sont normaux comme forme, couleur et poids. On note seulement une hypertrophie légère du foie et de la rate. Le critérium de la cause de la mort se trouve dans les frottis de rate et de foie toujours criblés de bacilles très nets, quelle que soit la coloration employée. C'est le type classique décrit par Yersin. Ajoutons, toutefois, que nous n'avons jamais

rencontré l'hypertrophie « considérable de la rate et du foie » signalée dans ce cas.

Voici, d'ailleurs, le poids moyen des organes des témoins morts suivant le type Yersin, 11 à 22 jours après l'inoculation.

Foie . . . . .	65 gr. »	Bacilles très nombreux.
Rate . . . . .	1 gr. 5	Bacilles nombreux.
Reins . . . . .	8 gr. (chaque).	Pas de bacilles.
Poumons . . . .	11 gr. (les deux).	Pas de bacilles.

Jamais nous n'avons constaté la forme granulique à l'autopsie des animaux.

#### INOCULATIONS INTRAVÉSICULAIRES.

Lapin n° 18, reçoit, le 13 mai, une inoculation de bacille tuberculeux aviaire dans la vésicule biliaire. La vésicule a été

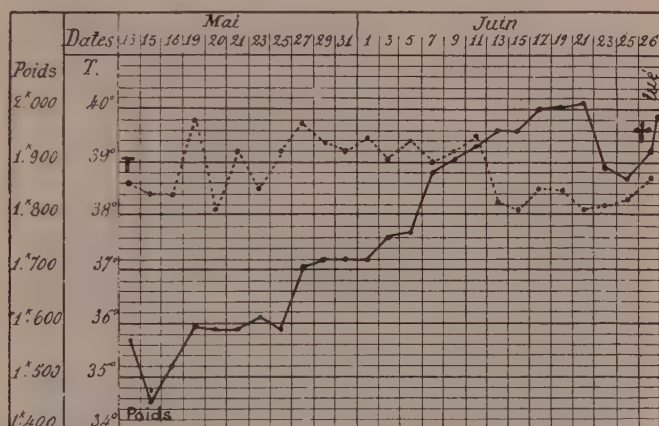


FIG. 8.

préalablement vidée de son contenu. La quantité de bacilles inoculés est de deux oses environ, diluées dans 1 centimètre cube d'eau physiologique. Les bacilles proviennent d'une culture sur pomme de terre glycinée à 37 degrés, âgée de 1 mois.

Poids de l'animal avant l'opération : 1.570.

Le 26 juin, c'est-à-dire 42 jours après, alors qu'il était en parfait état, l'animal est sacrifié (voir figure 8).

Son poids avait atteint 2 kilogrammes. Aucune modification extérieure; l'aspect de tous les organes: poumons, cœur, foie, rate, reins, intestins et séreuses, est normal.

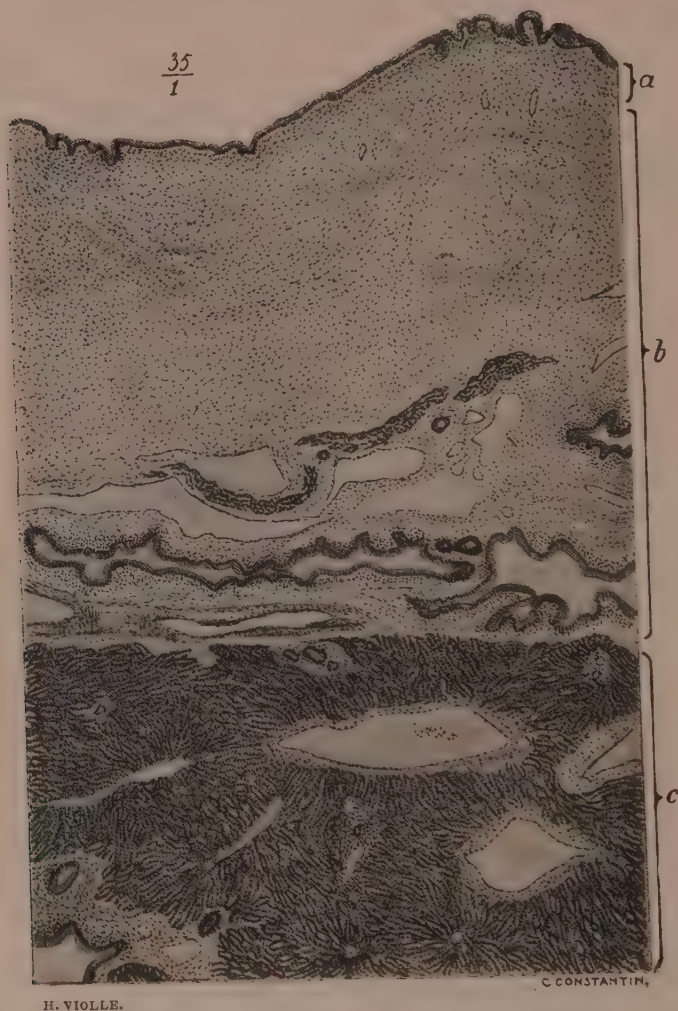


FIG. 9. — *Vésicule biliaire. — Tuberculose aviaire.*

*a*, muqueuse. — *b*, couche conjonctivo-fibreuse (très fortement épaissie et vascularisée). — *c*, tissu hépatique.

Voici d'ailleurs les poids moyens trouvés dans les autopsies faites chez différents animaux, dans les mêmes conditions :



Foie . . . . .	50 à 70 grammes.
Rate . . . . .	0 gr. 75 à 2 grammes.
Reins . . . . .	6 à 8 gr. (un seul.)
Poumons . . . . .	10 à 15 gr. (les deux.)

La vésicule biliaire seule est modifiée (voir figure 9) et présente les lésions décrites dans la première partie de cet ouvrage.

L'inoculation du liquide vésiculaire, sous le pli de l'aîne d'un cobaye, ne donne, après 2 mois, aucun résultat, l'animal n'ayant pas présenté de réaction locale ni ganglionnaire. A l'autopsie, aucune lésion organique, ni macroscopique ni microscopique.

Des frottis des différents organes du lapin inoculé : foie, rate, reins, poumons, moelle osseuse, ne montrent pas de bacilles tuberculeux.

Des inoculations de fragments de ces différents organes chez les cobayes restent négatives.

Des coupes histologiques de ces mêmes organes ne révèlent pas la présence du bacille tuberculeux.

En résumé, le lapin inoculé dans la vésicule biliaire, un mois et demi auparavant, avec des bacilles tuberculeux à dose mortelle, a résisté. La réaction a eu lieu seulement localement. Au niveau de la région inoculée, elle s'est manifestée par un apport assez considérable de leucocytes. L'infection ne s'est généralisée à aucun moment; l'organisme ne présente aucune trace de lésions anciennes ou récentes et une absence totale de ganglions suspects.

Tous les cas d'animaux inoculés peuvent être considérés comme calqués sur le précédent.

Les lapins témoins de même poids, inoculés en injection intraveineuse, avec une quantité équivalente de bacilles tuberculeux, sont tous morts rapidement (voir chapitre précédent).

#### INOCULATION INTRAVÉSICULAIRE SUIVIE D'INJECTION INTRAVEINEUSE.

Inoculation le 13 mai au lapin 36 dans la vésicule biliaire, préalablement vidée, de 2 öses environ de bacilles tuberculeux aviaires dilués dans 1 centimètre cube d'eau physiologique. La culture est âgée de 1 mois sur pomme de terre glycérianée à 37°.

Le 17 juillet, c'est-à-dire 2 mois environ après l'inoculation, le lapin 36 et le lapin 26 (témoin) reçoivent chacun une

injection intraveineuse de bacille tuberculeux (1/3 tube de culture diluée dans 2 centimètres cube d'eau physiologique; culture aviaire sur pomme de terre glycinée de 2 mois à 37 degrés).

Le 31 juillet, c'est-à-dire 13 jours après l'inoculation, le lapin 26 meurt. A l'autopsie, lésions type Yersin.

Le 19 octobre, plus de 5 mois après la première inoculation intravésiculaire, bacillaire, et plus de 3 mois après l'injection intraveineuse également bacillaire, l'animal n° 36, en excellent

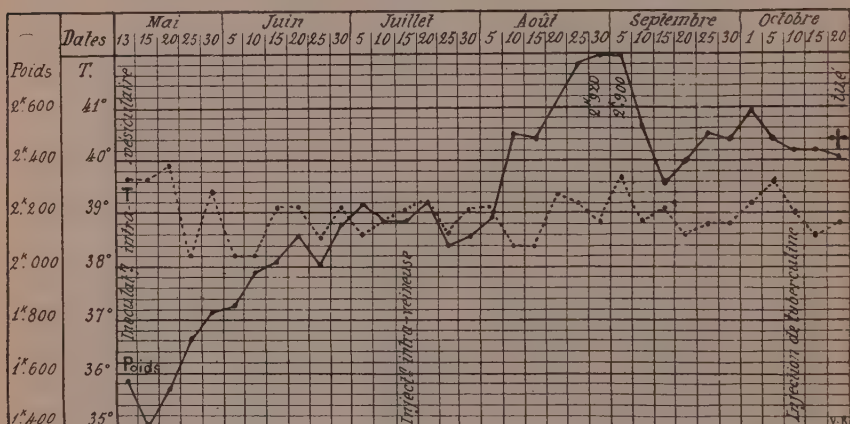


FIG. 10.

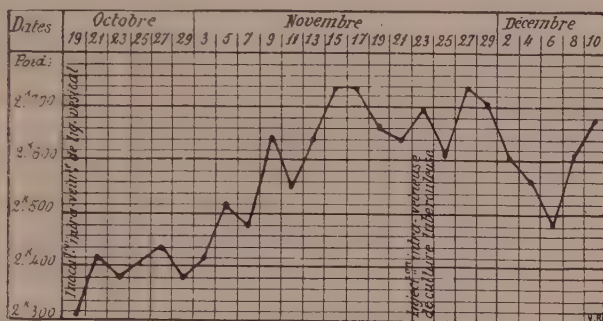
état, est sacrifié. A l'autopsie, aucune lésion macroscopique ni microscopique. Frottis des organes, ainsi qu'inoculations, négatifs.

La vésicule biliaire, de grosse dimension (17 gr. 50), présente les lésions déjà décrites précédemment.

Le liquide, environ 5 centimètres cubes (polynucléaires, la plupart dégénérés; et bacilles tuberculeux en assez grande abondance, prenant mal les colorants), est délayé dans une quantité égale d'eau physiologique et inoculé à un lapin (n° 84) en injection intraveineuse : 1 mois après l'inoculation, l'animal n'avait encore présenté aucune réaction; son poids avait sensiblement augmenté (voir fig. 11). Le 22 novembre, il reçoit avec un témoin une injection intraveineuse tuberculeuse. Le 10 décembre, le témoin meurt avec lésions tuberculeuses; l'autre animal, tué, ne présente aucune lésion spécifique.

Le lapin précédent, n° 36, présenta à l'autopsie 3 ganglions; l'un adossé à la colonne vertébrale, derrière le foie; l'autre, trachéo-bronchique, le troisième dans le bassin, adossé à une des veines iliaques; tous trois étaient de la grosseur d'un grain de blé, blancs, durs à la coupe, se composant d'une coque fibreuse et d'un contenu caséux. Sur frottis, on ne constate pas la présence de bacilles, mais de quelques cellules géantes.

Inoculés après broyage et dilution en eau physiologique dans le pli de l'aîne d'un cobaye, les ganglions ne donnent lieu à aucun retentissement ganglionnaire après plus de 2 mois. En coupe histologique, ces ganglions montrent des lésions de



Lapin n° 42, inoculé le 26 juin, intravésicairement, avec une dose de culture aviaire sur gélose glycerinée à 37 degrés de 50 jours.

Le 22 août, c'est-à-dire 56 jours après l'inoculation, l'animal en pleine santé reçoit une injection intraveineuse tuberculeuse (1/2 culture sur gélose glycerinée à 37 degrés de 2 mois 1/2). Le surlendemain, l'animal est sacrifié. A l'autopsie : organes normaux, pas de lésions congestives, pas de liquide dans les séreuses, pas de ganglions. La vésicule présente les lésions habituelles, macroscopiques et microscopiques ; absence de bacilles dans tous les organes, sauf la rate, qui en contient une très faible quantité, et les reins où il y en a moins encore.

D'après ces faits, les bacilles paraîtraient soit éliminés au dehors (par les reins ou l'intestin), soit détruits *in vivo* (rate et organes lymphoïdes).

La présence de très rares bacilles au niveau de l'épithélium rénal semblerait permettre de croire à leur élimination par cette voie. Cependant, les inoculations, chez les cobayes, du culot de centrifugation de 5 centimètres cubes d'urine recueillie aseptiquement 24 heures après l'injection bacillaire intraveineuse, sont demeurées négatives après plus de 3 mois.

Quant à la voie intestinale, la méthode employée par Calmette avec succès chez le bœuf nous a donné sur 6 cobayes, après plus de 3 mois, 6 cas négatifs (inoculation de 1 gramme de matières fécales recueillies 24 heures après l'injection bacillaire intraveineuse).

Afin d'essayer de déterminer la durée de persistance des bacilles injectés dans les veines après l'inoculation vaccinnante intravésiculaire, nous avons fait la recherche de bacilles tuberculeux dans le sang par le double procédé employé chez l'homme par Nattan-Larrier et Loeper-Louste. On agissait sur 10 centimètres cubes de sang pris par ponction intracardiaque et hémolysés immédiatement, soit par l'eau distillée dans la proportion de 10 centimètres cubes de sang pour 120 centimètres cubes d'eau (Nattan-Larrier), soit par l'alcool au tiers dans la proportion de 10 centimètres cubes de sang pour 20 centimètres cubes d'alcool (Loeper-Louste) ; puis on laissait reposer et on centrifugeait. Le culot de centrifugation, étalé sur lames et coloré, ne nous a jamais permis de découvrir le bacille dans



le sang, pris 24, 48 et 52 heures après l'inoculation intraveineuse. D'autres culots délayés dans un peu d'eau physiologique, puis inoculés aux cobayes (expériences sur 8 animaux), n'ont donné également aucun résultat positif.

La tuberculose chez le lapin n° 36, vacciné intravésiculairement, puis inoculé dans les veines, s'est signalée à l'autopsie par un nombre très élevé de bacilles dans la vésicule, et par l'apparition de ganglions dans l'organisme.

La présence de bacilles dans la vésicule est normale, puisque l'animal avait été inoculé en ce point. Mais ces bacilles injectés 5 mois auparavant, partiellement dégénérés, ne déterminent chez le cobaye et le lapin aucune lésion, et cela établit que les bacilles sont morts ou que, vivants, ils sont avirulents.

La présence de lésions ganglionnaires dans l'organisme en des points différents prouve qu'il y a eu lutte contre l'envahissement par le bacille tuberculeux; mais à quel moment?

Après l'inoculation intravésiculaire? Assurément non, puisque tous les animaux inoculés exclusivement dans la vésicule biliaire n'ont jamais présenté d'adénite consécutive.

Après l'injection intraveineuse? Mais toute injection intraveineuse de bacilles virulents cause la mort de l'animal en l'espace de 15 à 20 jours, suivant le type Yersin, c'est-à-dire sans provoquer aucune réaction ganglionnaire.

Quoi qu'il en soit, la présence de ganglions indiquant une réaction de défense, on doit en conclure que l'animal était immunisé; et, comme les ganglions sont peu nombreux et de petite dimension, et ne présentent ni périadénite, ni suppuration, l'immunité était très active. En fait, 2 mois après l'inoculation intraveineuse des bacilles tuberculeux, aucun vestige bacillaire ne persiste dans l'organisme. Et cependant ces bacilles étaient doués d'une grande virulence puisque les témoins mouraient en l'espace de 2 semaines, alors même qu'ils étaient inoculés avec des quantités très faibles.

Ainsi, un lapin vacciné par inoculation préalable de bacilles virulents dans la vésicule biliaire est capable de résister à l'inoculation intraveineuse d'une culture tuberculeuse virulente, inoculation toujours rapidement mortelle chez les témoins.

Un lapin rendu tuberculeux par inoculation sous-cutanée et mieux intrapéritonéale ou intraveineuse réagit quelquefois

fortement, généralement avec intensité, mais presque toujours nettement à une seconde injection tuberculeuse (phénomène de Koch) en présentant des phénomènes locaux ou généraux, ou les deux associés (1).

L'absence totale de réaction, même légère, même fugace, chez un lapin inoculé préalablement dans la vésicule et secondairement dans les veines avec une culture tuberculeuse, tendrait donc à prouver que l'animal est « vacciné » dans le sens où l'on emploie couramment ce terme, c'est-à-dire incapable de succomber à une nouvelle atteinte du bacille; qu'il est physiologiquement ou humoralement vacciné, c'est-à-dire que dans son organisme ne circulerait plus de tuberculine capable par l'addition d'une nouvelle dose de tuberculine (culture de bacilles ou toxines) de produire des phénomènes de superintoxication ou d'anaphylaxie.

On pourrait cependant admettre au contraire que l'animal ainsi vacciné aurait produit d'une façon lente et continue, sous l'influence de la dose initiale de bacilles tuberculeux inoculés intravésiculairement, de l'antituberculine, dont la présence ne se manifesterait par aucune action générale consécutive.

#### PROPRIÉTÉS DU SÉRUM.

Les lapins inoculés dans la vésicule biliaire avec une culture tuberculeuse aviaire, suivant la méthode indiquée précédemment, fournissent un sérum dont on a essayé de déterminer le pouvoir immunisant, soit chez les cobayes, soit chez les lapins.

Voici quelques exemples tirés des expériences faites :

*Premier cas :* 28 juin, injection sous-cutanée de 2 centimètres cubes de sérum (d'un lapin inoculé intravésiculairement 2 mois auparavant avec une culture tuberculeuse) aux 2 cobayes 28 et 29.

29 juin, 2<sup>e</sup> injection identique à la précédente.

Ce même jour, les 2 cobayes 28 et 29 et 2 autres cobayes 30 et 31 (témoins) reçoivent, sous la peau, au niveau de la face

(1) L'épreuve de la tuberculine-réaction, faite chez des lapins ayant reçu des bacilles tuberculeux, les uns en inoculations intravésiculaires, les autres en inoculations intraveineuses, d'autres en les deux voies, n'a pas fourni de résultats caractéristiques. On sait que les lapins réagissent mal, ou plus exactement, très inégalement, à la tuberculine (Arloing, Rodet et Courmont).

interne de la cuisse, 1 öse de bacilles tuberculeux aviaires (cultivés sur milieu de Lumière de 20 jours, à 37 degrés).

Le 30 juin, 3<sup>e</sup> injection de 2 centimètres cubes de sérum aux 2 cobayes 28 et 29.

Le 1<sup>er</sup> juillet, 4<sup>e</sup> injection de 3 cent. cubes de sérum aux mêmes animaux.

Le 3 juillet, 5<sup>e</sup> injection de 3 cent. cubes de sérum aux mêmes animaux.

Le 8 juillet, on constate l'apparition chez tous les cobayes de petits ganglions roulant sous le doigt, ayant la grosseur d'un pois et indolores.

Dans le courant du mois de juillet, chez les cobayes témoins 30 et 31, ces ganglions augmentent progressivement du côté du point d'inoculation, d'autres apparaissent de l'autre côté. Les ganglions restent petits, unilatéraux et insignifiants chez le cobaye 28. Le cobaye 29 a succombé peu après l'inoculation, probablement de septicémie ou d'anaphylaxie.

Le cobaye 31 meurt le 31 juillet, et son autopsie décèle des lésions typiques de tuberculose : la rate principalement contient des bacilles.

Le cobaye 30 meurt le 1<sup>er</sup> août, avec également quelques lésions tuberculeuses.

Quant au cobaye 29, il était encore vivant 6 mois après l'inoculation, ne présentant aucune lésion apparente ; son poids avait passé de 130 à 260 grammes.

*Deuxième cas :* Cobaye 75 reçoit en injection sous-cutanée 4 centimètres cubes d'un mélange de culture tuberculeuse et de sérum, resté 1 heure à l'étuve à 37 degrés et présentant après ce temps une forte agglutination. Le sérum provient d'un lapin inoculé 1 mois 1/2 auparavant dans la vésicule biliaire avec une émulsion de bacilles tuberculeux virulents.

Cobaye 76 reçoit préventivement en injection sous-cutanée 6 centimètres cubes de sérum, puis 24 heures après, une inoculation de bacilles tuberculeux.

Cobaye 77 reçoit, en injection sous-cutanée, une culture tuberculeuse seule (animal témoin).

Chez les 3 cobayes, les cultures tuberculeuses inoculées étaient équivalentes en quantité : 1 öse de bacilles tuberculeux de quinze jours sur gélose glycinée à 37 degrés.



Le témoin 77 meurt 34 jours après l'inoculation, avec des lésions tuberculeuses (rate, foie contenant des bacilles tuberculeux), après avoir présenté un amaigrissement notable.

Le cobaye 75 est tué à même date. Poids légèrement diminué. A l'autopsie, ganglions de la grosseur d'une noisette au niveau du point d'inoculation avec contenu caséeux et bacilles, mais sans suppuration. Le foie, la rate et le pancréas contiennent quelques bacilles tuberculeux.

Le cobaye 76, tué également le même jour, a augmenté de poids. Il présente un ganglion à contenu caséeux avec zone périphérique sclérosée, au point d'inoculation. Très peu de bacilles dans ce pus. Les organes sont normaux : le foie et la rate ne contiennent aucun bacille ; absence de bacilles également dans les autres organes.

*Troisième cas :* Cobaye 23. Reçoit en injection sous-cutanée 2 centimètres cubes de sérum provenant d'un lapin inoculé dans la vésicule biliaire 1 mois auparavant avec culture tuberculeuse virulente, puis 2 heures après cette première injection un mélange de 4 centimètres cubes du même sérum et 2 spatules (environ 6 öses) de bacilles tuberculeux (culture de 23 jours sur pomme de terre glycinée à 37 degrés).

Cobaye 24, témoin, reçoit une culture tuberculeuse seule, en quantité équivalente à celle qui a été inoculée au cobaye précédent.

31 jours après l'inoculation, le témoin meurt, amaigri, avec lésions tuberculeuses généralisées (rate et foie contenant des bacilles tuberculeux).

Le cobaye 23, alors bien portant, et ayant augmenté de poids, est tué le même jour. Ganglions de la grosseur d'une noisette au niveau du point d'inoculation, avec zone fibreuse périphérique. Le contenu caséeux renferme des bacilles en assez grande proportion. Aucune généralisation : tous les organes sont sains ; le foie et la rate ne renferment aucun bacille.

De tous ces faits, il résulte que les injections sous-cutanées de cultures vivantes et virulentes de tuberculose aviaire, à dose très élevée, ont tué, en provoquant des lésions de tuberculose généralisée, les témoins en 30 à 35 jours. Par contre, les animaux qui ont reçu préventivement, en injection sous-cutanée, du sérum d'animaux vaccinés intravésiculairement, à la dose de 10 centimètres cubes, résistent, ne présentant



qu'une lésion locale, au niveau du point d'inoculation, et aucune généralisation du bacille après plus d'un mois. Les doses moins élevées, injectées préventivement ou mélangées à la culture tuberculeuse, semblent insuffisantes.

Le mélange de culture tuberculeuse et de sérum en quantité suffisante, provenant d'un animal vacciné, paraît avoir perdu sa virulence. Les résultats furent toujours identiques, quoique les expériences tendant à établir ce fait fussent par 5 fois répétées. Elles peuvent être, dans leur ensemble, résumées ainsi :

Lapin A, reçoit un mélange de 5 centimètres cubes de sérum d'un lapin inoculé intravésiculairement 1 à 3 mois auparavant, et d'une culture tuberculeuse (1/8 tube de culture de tuberculose aviaire sur gélose glycinée de 1 à 2 mois à 37 degrés, diluée dans 10 centimètres cubes d'eau physiologique). Le mélange bien agité a été laissé en contact 2 heures à 37 degrés. On inocule les 10 centimètres cubes dans la veine marginale de l'oreille d'un lapin neuf.

Lapin B, sert d'animal témoin ; il reçoit, en injection intraveineuse également, la même quantité de bacilles tuberculeux, dilués dans la même quantité d'eau physiologique.

Après une période de 12 à 15 jours, l'animal témoin B meurt de tuberculose à type Yersin.

L'animal A, ayant reçu le mélange, résiste et ne présente à aucun moment une réaction quelconque, pouvant se traduire par une diminution de poids ou une élévation de température. Sacrifié 2 mois après l'inoculation intraveineuse, l'animal, en parfait état, ne montre aucune lésion tuberculeuse.

Il s'ensuit donc qu'une culture tuberculeuse, additionnée de sérum selon le mode indiqué, paraît totalement avirulente alors que la même culture, injectée seule, cause la mort de l'animal témoin très rapidement.

Le mélange préparé comme nous l'avons dit ci-dessus, et laissé 2 heures à l'étuve à 37 degrés, n'est plus, à l'inverse du tube témoin qui ne renferme qu'une émulsion de bacille tuberculeux, une solution trouble et laiteuse. Le liquide s'est séparé en deux couches absolument nettes et distinctes : l'une inférieure, pâteuse, floconneuse, blanche, dense, composée exclusivement de bacilles ; l'autre supérieure, claire, ambrée, qui n'est autre que le sérum surnageant. Il y a donc eu agglutination totale

ou précipitation en 2 heures de tous les éléments bacillaires sous l'influence du sérum. Cela peut permettre, *a priori*, d'interpréter les différences essentielles de réactions que l'on constatera chez les animaux injectés ou témoins.

## CONCLUSIONS

L'inoculation de divers antigènes dans la vésicule biliaire du lapin, au préalable transformée en sac vide et clos, provoque chez l'animal opéré la formation d'anticorps correspondants spécifiques.

Ce mode d'inoculation est aisé à pratiquer. Il ne fait jamais éprouver à l'animal de violentes réactions.

Bien conduite, l'immunisation se fait rapidement dans la plupart des cas. Elle ne présente pas de phases négatives; sa durée semble fort longue.

Dans le cas où cette immunisation paraîtrait trop légère, des injections intraveineuses consécutives du même antigène permettent de mettre, sans réaction, l'animal en état d'hyper-immunisation.

Les bactéries employées comme antigènes engendrent des anticorps immunisants (immunisation active) et le sérum des animaux vaccinés est généralement doué de propriétés immunisantes, bactériennes et antitoxiques (immunisation passive).

Les anticorps paraissent essentiellement formés aux dépens des leucocytes qui, attirés par l'antigène, pénètrent dans la vésicule, grâce aux connections vasculaires hépato-vésiculaires.

Le foie agirait comme réservoir de sang et par suite de globules blancs.

## EXPLICATION DES PLANCHES XII ET XIII

PL. XII. *Figure 1.* — Muqueuse de la vésicule biliaire. Choléra;  
a, polynucléaire; b, figure de mitose; c, cellule de la muqueuse;  
d, polynucléaire; e, tissu conjonctif.

*Figure 2.* — Tissu hépatique contigu à la vésicule biliaire.  
a, cellule hépatique; b, polynucléaire; c, figure de caryocinèse.

PL. XIII. *Figure 1.* — Vésicule biliaire et son contenu. Choléra.  
a, polynucléaires; b, chorion; c, endothélium; d, tissu conjonctif.

*Figure 2.* — Vésicule biliaire et son contenu. Tuberculose aviaire.  
a, bacille tuberculeux aviaire; b, globules blancs dégénérés; c, polynucléaire; d, cellules endothéliales; e, mononucléaires; f, tissu conjonctif.

---

Le Gérant : G. MASSON.